

Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department der Tierärztlichen Fakultät

der Ludwig-Maximilians-Universität München

Arbeit angefertigt unter der Leitung von

– Univ.-Prof. Dr. Dr. h.c. E. Märtlbauer –

**Wirkungsweise des *Bacillus cereus* Enterotoxins Nhe:
Bedeutung der Komplexbildung zwischen NheB und NheC**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde

der Tierärztlichen Fakultät

der Ludwig-Maximilians-Universität München

von

Uta Heilkenbrinker

aus Gronau (Westf.)

München 2014

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Joachim Braun

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Dr. h.c. Erwin Märtlbauer

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger

Tag der Promotion: 08. Februar 2014

Meiner Familie

I	EINLEITUNG	1
II	SCHRIFTTUM	3
1	Allgemeines	3
1.1	Taxonomische Stellung	3
1.2	Problemstellung und historischer Überblick	4
2	Pathogene Bedeutung von <i>Bacillus cereus</i>	6
2.1	Gastrointestinale Krankheitsbilder	7
2.2	Extraintestinale Krankheitsbilder	8
3	<i>Bacillus cereus</i> als Verursacher gastrointestinaler Erkrankungen	9
3.1	Potentielle Virulenzfaktoren im Überblick	9
3.2	Emetisches Toxin – Cereulid	11
3.3	Enterotoxine – CytK, Hbl und Nhe	12
3.3.1	Regulation der Toxinexpression und Sekretion der Toxine	12
3.3.2	Cytotoxin K (CytK)	14
3.3.3	Hämolysin BL (Hbl)	15
3.3.4	Non-haemolytic Enterotoxin (Nhe)	16
3.3.5	Nachweisverfahren für <i>B. cereus</i> -Enterotoxine	20
III	PUBLIKATION	22
	Complex Formation between NheB and NheC Is Necessary to Induce Cytotoxic Activity by the Three-Component <i>Bacillus cereus</i> Nhe Enterotoxin	
IV	DISKUSSION	56
V	ZUSAMMENFASSUNG	70
VI	SUMMARY	72
VII	LITERATURVERZEICHNIS	74

5-HT ₃	5-Hydroxy-Tryptamin ₃
A204	Humane Rhabdomyosarkomzelllinie
A549	Humane Lungenkarzinomzelllinie
AbrB	Transkriptionsfaktor
ATCC	American Type Culture Collection
ATPase	Adenosintriphosphatase
<i>B.</i>	<i>Bacillus</i>
BceT	<i>Bacillus cereus</i> Enterotoxin T
BCET-RPLA	<i>Bacillus cereus</i> enterotoxin-reversed passive latex agglutination, Reverser Latexagglutinationstest
BDE-VIA	<i>Bacillus</i> diarrhoeal enterotoxin visual immunoassay
BSA	Bovines Serumalbumin
<i>C.</i>	<i>Clostridium</i>
Caco-2	Zelllinie aus Colonadenokarzinomzellen
<i>ces</i>	Cereulid-Synthetase
CHO	Zelllinie aus Ovarienzellen chinesischer Hamster
ClyA	Cytolysin A
CNBr	Cyanogenbromid
<i>cspA</i>	Kälteschock-Protein-A-Gen
CT	Cytotoxicity test, Zytotoxizitätstest
CwpFM	Cell wall peptidase FM
CytK	Cytotoxin K
<i>cytK</i>	Gene des CytK
Da	Dalton
DNA	Deoxyribonucleic acid, Desoxyribonukleinsäure

<i>E.</i>	<i>Escherichia</i>
EFSA	European Food Safety Association
EIA	Enzyme immunoassay, Enzymimmuntest
EntA, EntB, EntC	Enterotoxin A, Enterotoxin B, Enterotoxin C
EntFM	Enterotoxin FM
EU	Europäische Union
Fnr	Fumarat/Nitrat-Regulator
GH4	Rattenhypophysenzellen
Hbl	Hämolysin BL
<i>hbl</i>	Gene des Hämolysin BL
HEp-2	Zelllinie aus humanen Larynxkarzinomzellen
HepG2	Zelllinie aus humanen Leberzellkarzinomzellen
His	Histidin
HlyE	Hämolysin E
HlyII	Hämolysin II
HRP	Horseradish peroxidase, Meerrettichperoxidase
HUVEC	Humane Nabelschnurvenen-Endothelzellen
IAC	Immunaффinitätschromatographie
IgG	Immunglobulin G, Gammaglobulin
IgM	Immunglobulin M
IJSEM	International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology
IMAC	Immobilisierte Metallionen-Aффinitätschromatographie
InhA1	Immuninhibitor A1
<i>inhA1</i>	Gen von Immuninhibitor A1

IPTG	Isopropyl-β-D-1-thiogalaktopyranosid
kb	Kilobasen
KbE	Koloniebildende Einheit
kDa	Kilodalton
mAb	Monoclonal antibody
mAk	Monoklonaler Antikörper
MALDI	Matrix-assisted laser desorption/ionization, Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation
McCoy	Mäusefibroblasten
MHI	Stammsammlung, Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch, (Milchhygieneinstitut)
MLST	Multi-Locus Sequence Typing
MLT	Mouse Lethality Test, Mausletalitätstest
mRNA	Messenger ribonucleic acid, Boten-Ribonukleinsäure
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
Nhe	Non-haemolytic Enterotoxin
<i>nhe</i>	Gene des Non-haemolytic Enterotoxin
Ni ²⁺	Nickelionen
NRPS	Nichtribosomale Peptidsynthetase
NTA	Nitriloessigsäure
NVH	Norwegische Sammlung von Mikroorganismen, Norwegian School of Veterinary Science, (Norges veterinærhøgskole)
OD	Optical density, optische Dichte
PapR	Signalpeptid
PBS	Phosphate buffered saline, phosphatgepufferte Kochsalzlösung

PCR	Polymerase chain reaction, Polymerase Kettenreaktion
PDB	Proteindatenbank
Ped-2E9	Zelllinie aus murinen Lymphozyten
PFT	Pore-forming toxin; porenbildendes Toxin
pH	pondus Hydrogenii
PlcR	Phospholipase C Regulator
RIL	Rabbit ileal loop test, Darmschlingenligationstest beim Kaninchen
RNA	Ribonucleic acid, Ribonukleinsäure
rNheC	Rekombinantes Non-haemolytic Enterotoxin C
rRNA	Ribosomal ribonucleic acid, ribosomale Ribonukleinsäure
S	Svedberg-Einheit
<i>S.</i>	<i>Staphylococcus</i>
SDS	Sodium dodecyl sulfate, Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
Spo0A	Sporulationsfaktor
<i>spp.</i>	<i>species pluralis</i>
TOF/MS	Time of flight/mass spectrometry, Flugzeit/Massenspektrometrie
USA	United States of America, Vereinigte Staaten von Amerika
Vero	Zelllinie aus Affennierenzellen
VPR	Vascular Permeability Reaction; vaskuläre Permeabilitätsreaktion
WST	Water-soluble tetrazolium salt, wasserlösliches Tetrazoliumsalz

I EINLEITUNG

Bacillus (B.) cereus ist ein ubiquitäres, bewegliches, grampositives, fakultativ anaerobes Bodenbakterium, welches als Sporenbildner in der Umwelt persistiert. Hohe Widerstandsfähigkeit gegenüber diversen Umwelt- und technologischen Einflüssen sowie ausgeprägte lipo- und proteolytische Eigenschaften machen *B. cereus* zu einem Problemkeim für die Lebensmittelindustrie und Lebensmittelhygiene. Infolge Umwelt- oder Kreuzkontaminationen wird *B. cereus* regelmäßig aus diversen Lebensmitteln pflanzlicher und tierischer Herkunft (z. B. Reis, Gemüse, Gewürze, Milch, Fleisch) sowie deren Verarbeitungsprodukten isoliert (Kramer & Gilbert, 1989).

Bei einer Vermehrung auf Keimgehalte von mehr als 10^5 KbE/g (emetische Stämme) bzw. über 10^4 KbE/g (enteropathogene Stämme), kann *B. cereus* aufgrund seines Toxinbildungsvermögens im Lebensmittel bzw. im Darm kritische Toxinmengen produzieren, welche beim Menschen Lebensmittelvergiftungen verursachen (Logan, 2012). Hierbei gilt es grundsätzlich zwei Erkrankungsformen zu unterscheiden: Das emetische Syndrom wird durch eine Lebensmittelintoxikation mit dem von emetischen *B. cereus* bereits im Lebensmittel produzierten hitzestabilen emetischen Toxin Cereulid hervorgerufen (Ehling-Schulz et al., 2004). Beim diarrhoeischen Syndrom dagegen werden vegetative Zellen oder Endosporen enteropathogener *B. cereus*-Stämme aufgenommen, welche erst im Darm hitzelabile Enterotoxine bilden (Stenfors Arnesen et al., 2008).

Am Diarrhoe-Syndrom ursächlich beteiligt sind die aus je drei Komponenten bestehenden Enterotoxinkomplexe Hämolysin BL (Hbl) (Beecher & Macmillan, 1991) und Non-haemolytic Enterotoxin (Nhe) (Lund & Granum, 1996), sowie das Einzeltoxin Cytotoxin K (CytK) (Lund et al., 2000). Fast alle *B. cereus*-Stämme besitzen mindestens eines der Enterotoxingene, wobei *nhe* bei nahezu 100 % der Stämme nachweisbar ist (Guinebretière et al., 2002; Moravek et al., 2006). Nhe, dessen Virulenz durch die stammabhängig unterschiedlich produzierte Toxinkonzentration bedingt ist (Dietrich et al., 2005; Moravek et al., 2006), besitzt zytotoxisches Potential gegenüber tierischen und humanen Zelllinien (Didier et al., 2012). Neben Hbl ist Nhe unter den bisher beschriebenen bakteriellen Toxinen in seiner für volles zytotoxisches Potential erforderlichen Zusammensetzung aus drei Proteinen (NheA, NheB und NheC) einzigartig. In den vergangenen Jahren konnte gezeigt werden, dass für eine maximale biologische Aktivität nicht nur ein bestimmtes molares

Verhältnis der Einzelkomponenten notwendig ist, sondern auch eine geordnete Bindungsreihenfolge an die Zielzelle (Lindbäck et al., 2004; Lindbäck et al., 2010). Die dabei notwendigen molekularen Interaktionen sind noch nicht vollständig geklärt.

Durch die Produktion monoklonaler Antikörper (mAk) gegen NheB konnten funktionell wichtige Domänen des Proteins charakterisiert werden. Für NheC stand bislang ein polyklonales Kaninchen-Antiserum zur Verfügung (Dietrich et al., 2005), welches eine Charakterisierung von NheC bisher nur in begrenztem Umfang ermöglichte.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es deshalb, monoklonale Antikörper gegen NheC zu produzieren. Zur Durchführung der Versuche und für die Gewinnung eines geeigneten Immunogens galt es im Vorfeld effektive Anzucht- und Herstellungsbedingungen für von *Escherichia (E.) coli* exprimiertes rekombinantes NheC (rNheC) zu etablieren und dieses anschließend per Immunaффinitätschromatographie (IAC) aufzureinigen. Nach einer umfassenden Charakterisierung von insgesamt vier mAk konnten diese in diversen Testsystemen eingesetzt werden. Dazu zählten die Etablierung von verschiedenen indirekten und Sandwich-Immunassays, der Einsatz in Immunblot-Verfahren, in der Immunfluoreszenz und in der Durchflusszytometrie. Erstmalig war es so möglich, die Bindung von NheC an seine Zielzellen darzustellen. Zudem ergaben die Untersuchungen neue Erkenntnisse über die Interaktionen von NheB und NheC aus natürlichen Überständen in Lösung. Aus diesen Ergebnissen lässt sich die bisherige Modellvorstellung über die zytotoxische Wirkung von Nhe erweitern.

II SCHRIFTTUM

1 Allgemeines

1.1 Taxonomische Stellung

Bacillus (B.) cereus ist ein ubiquitäres, fakultativ anaerobes, bewegliches, endosporenbildendes, grampositives Stäbchen des Genus *Bacillus*. Gemeinsam mit den Spezies *B. weihenstephanensis*, *B. mycoides*, *B. pseudomycoides*, *B. anthracis* und *B. thuringiensis* bildet *B. cereus* (*B. cereus sensu stricto*) die genetisch höchst homogene „*Cereus*-Gruppe“, auch bekannt als *B. cereus sensu lato*, welche neben *B. megaterium* der morphologischen Gruppe 1A zugeordnet wird (Smith et al., 1946; Smith et al., 1952; Gibson & Gordon, 1974). Eine Differenzierung dieser sechs pleomorphen Spezies innerhalb der sogenannten *Cereus*-Gruppe ist nach Granum (2007) anhand der in Tabelle 1 erfassten Merkmale möglich.

Tabelle 1. Kriterien für Speziesdifferenzierung innerhalb der *Cereus*-Gruppe (Granum, 2007)

Spezies	Kolonie-morphologie	Hämolyse	Beweglich-keit	Penicillin-Empfindlichkeit	Parasporale Kristalle
<i>B. cereus</i>	weiß	+	+	–	–
<i>B. anthracis</i>	weiß	–	–	+	–
<i>B. thuringiensis</i>	weiß/grau	–	+	–	+
<i>B. mycoides</i>	rhizoid	(+)	–	–	–
<i>B. weihenstephanensis</i>	Abgrenzung zu <i>B. cereus</i> : Wachstum bei < 7 °C, kein Wachstum bei 43 °C; schnelle Identifizierung mittels PCR (rRNA oder Kälteschock-Protein-A-Gen <i>cspA</i>) (Lechner et al., 1998)				
<i>B. pseudomycoides</i>	Unterscheidung von <i>B. mycoides</i> nur anhand des Fettsäuremusters und der 16S rRNA-Sequenz (Nakamura, 1998)				

Bereits Anfang 2012 (Guinebretière et al., 2013) lag beim International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology (IJSEM) der Vorschlag für eine neue thermotolerante Spezies vor, welche wegen hochgradiger geno- und phänotypischer Ähnlichkeiten als weitere Spezies der oben beschriebenen *Bacillus cereus*-Gruppe zugeordnet werden konnte. Aufgrund der Fähigkeit Diarrhoe-verursachendes Cytotoxin K (CytK) zu bilden (Lund et al., 2000), wurde für die neue Spezies der Name „*B. cytotoxicus*“ vorgeschlagen (Lapidus et al., 2008). Die offizielle Anerkennung von *B. cytotoxicus* als eigene der *Cereus*-Gruppe angehörige Spezies ist erst kürzlich erfolgt (Guinebretière et al., 2013). Untersuchungen der 16S rRNA-Sequenz des Referenz- bzw. Typstammes NVH 391-98 und weiterer ähnlicher Isolate ergaben eine 97- bis 98-prozentige Übereinstimmung mit *B. cereus sensu lato*. Innerhalb der *Cereus*-Gruppe jedoch, lässt sich *B. cytotoxicus* wiederum wegen seiner 16S rRNA-Sequenz und aufgrund von MLST-Ergebnissen eindeutig von den anderen sechs Spezies abgrenzen. Weitere Unterscheidungskriterien sind Wachstumstemperaturen zwischen 20 und 50 °C, was *B. cytotoxicus* als einzig thermotoleranten Stamm auszeichnet, sowie die fehlende Fähigkeit zur Stärkehydrolyse und Bildung parasporaler Kristalle. Außerdem zeigt *B. cytotoxicus* im Voges-Proskauer-Test nur schwache Reaktion und kann in künstlich hergestellten Medien ohne Zugabe von Tryptophan nicht wachsen (Lapidus et al., 2008; Guinebretière et al., 2013).

1.2 Problemstellung und historischer Überblick

Die Spezies *B. cereus* wurde erstmals beschrieben von Frankland & Frankland (1887), die den auf Blutplatten morphologisch wächsern (lat. *cereus*) erscheinenden Keim aus einer in einem Kuhstall gewonnenen Luftprobe isoliert hatten. Cohn (1876), Koch (1876) und Tyndall (1877) machten unabhängig voneinander erste Entdeckungen zur besonderen Überlebensfähigkeit diverser Organismen als Sporenbildner.

Durch seine Fähigkeit Endosporen als resistente Dauerformen zu bilden, ist *B. cereus* äußerst widerstandsfähig gegenüber Umwelteinflüssen wie extremen Temperaturen oder pH-Werten, Trockenheit und Strahlung (Nicholson et al., 2000; Faille et al., 2002). *B. cereus* ist in der Umwelt weit verbreitet, wo insbesondere im Erdboden ein saprophytärer Lebenszyklus nachgewiesen werden kann (Vilain et al., 2006). Von hier findet der Keim vielfältige Verbreitungswege in die Lebensmittelkette. Aufgrund von Kreuzkontaminationen lässt er sich nicht nur aus Bodenpartikeln, Staub und Pflanzen isolieren, sondern ebenfalls in Produkten wie Fleisch und Milch nachweisen (Kramer & Gilbert, 1989; Granum, 2007).

Für die Lebensmittelindustrie ergeben sich im Rahmen technologischer Prozesse, abgesehen von der Tenazität der Sporen gegenüber gängigen Wärmebehandlungsverfahren (z. B. Pasteurisierung), darüber hinaus zusätzliche Probleme durch die Ausbildung von Biofilmen. Diese schützen *B. cereus* weitgehend vor Reinigungs- und Desinfektionsmaßnahmen und begünstigen die passive Verbreitung der adhärenen Sporen (Ryu & Beuchat, 2005; Wijman et al., 2007; Faille et al., 2007). Kritisch ist ferner die Begünstigung von Lebensmittelverderb und lebensmittellozierten Erkrankungen durch *B. cereus* (Kotiranta et al., 2000; Becker et al., 2005), indem sich zum einen psychrotrophe Stämme noch bei Kühlschranktemperaturen vermehren, sowie zum anderen durch Fehler bei der Zubereitung und Kühlung von Lebensmitteln [häufig Reis; (Bryan, 1981; Ankolekar et al., 2009)]. Der als Süßgerinnung oder „bitty“/ „broken cream“ bezeichnete Verderb von Milch und Milchprodukten ist auf die ausgeprägt proteolytische Aktivität des hitzeresistenten und kältetoleranten Sporenbildners zurückzuführen (De Jonghe et al., 2010).

Zunehmend bedeutsam ist *B. cereus* als Verursacher sowohl extraintestinaler als auch gastrointestinaler Erkrankungen. Für den Lebensmittelbereich ist die Fähigkeit dieses Erregers zur Bildung von Enterotoxinen entscheidend. Lebensmittelintoxikationen und Lebensmittelinfektionen können die Folge sein, welche sich klinisch durch ihre Verlaufsform und Leitsymptome in ein emetisches Syndrom bzw. ein Diarrhoe-Syndrom unterscheiden lassen (Granum, 2007; Logan, 2012). Erste Anhaltspunkte für *B. cereus* als ursächlichen Erreger gastrointestinaler Erkrankungen finden sich in einer von Lubenau (1906) durchgeführten Studie im Zusammenhang mit einer Lebensmittelvergiftung in einer Lungenheilstätte. Die beschriebenen Eigenschaften des zunächst als „*Bacillus peptonificans*“ bezeichneten Isolates (Koloniemorphologie, Hämolyse, rasche Versporung, Glukoseabbau ohne Gasbildung, Gelatineverflüssigung, Eiweißabbau in Milch) geben Grund zur Annahme, dass es sich hierbei um *B. cereus* handelte (Becker et al., 2005). Erstmals identifiziert und wissenschaftlich nachgewiesen als Erreger von Durchfallerkrankungen (Diarrhoe-Form), bedingt durch Lebensmittelinfektionen, wurde *B. cereus* infolge eines Krankheitsausbruchs in einem norwegischen Krankenhaus 1948, sowie durch einen anschließend von Hauge beschriebenen Selbstversuch (Hauge, 1950; Hauge, 1955).

Das im Gegensatz dazu von Emesis geprägte Krankheitsbild (emetische Form) wurde zum ersten Mal Anfang der 1970er Jahre in Großbritannien dokumentiert (Public Health Laboratory Service, 1972; Public Health Laboratory Service, 1973; Mortimer & McCann, 1974). Bereits 1975 (Spira & Goepfert) wurde über erste Untersuchungen bezüglich toxischer Komponenten als Ursache gastrointestinaler Krankheitsbilder berichtet, worauf in den 1980er

Jahren verschiedene potentiell auslösende Pathogenitätsfaktoren, wie Cereolysin O und Phospholipasen C (Kreft et al., 1983; Kuppe et al., 1989), diskutiert wurden. Ab den 1990er Jahren gelang es dann neben der Beschreibung weiterer Virulenzfaktoren, vor allem die für die emetische und Diarrhoe-Form maßgeblichen *B. cereus*-Toxine bzw. *B. cereus*-Toxin-Komplexe (Agata et al., 1995b; Beecher et al., 1995; Lund & Granum, 1996; Granum et al., 1999; Lund et al., 2000) zu charakterisieren.

2 Pathogene Bedeutung von *Bacillus cereus*

In den vergangenen Jahren erwies sich *B. cereus* zunehmend als einer der wichtigsten Erreger lebensmittelassoziierter Erkrankungen, welche anhand der jeweiligen Leitsymptome in die oben genannten zwei Erkrankungsformen differenziert werden. Tendenziell ist in den Industriestaaten ein Anstieg an *B. cereus* -bedingten Erkrankungen festzustellen (Kotiranta et al., 2000; Ehling-Schulz et al., 2004). Laut des im April 2009 veröffentlichten Berichts der Europäischen Behörde für Lebensmittelsicherheit (European Food Safety Association, EFSA), war innerhalb der EU für das Jahr 2007 eine 32-prozentige Zunahme der durch *B. cereus*-Toxine verursachten Lebensmittelvergiftungen zu verzeichnen (EFSA, 2009). National lässt sich die tatsächliche Inzidenz an Krankheitsfällen jedoch schwer beziffern, was zum einen daran liegt, dass *B. cereus* in Deutschland nicht zu den nach Infektionsschutzgesetz § 7 (2000) meldepflichtigen bakteriellen Erregern gehört, zum anderen kommt es bei einer allein aufgrund der entsprechenden Symptomatik diagnostizierten Erkrankung durch *B. cereus* nicht selten zu Fehldiagnosen. So ähneln die Symptome der emetischen Form einer Lebensmittelintoxikation mit *Staphylococcus (S.) aureus*, während die der Diarrhoe-Form einer Lebensmittelvergiftung mit *Clostridium (C.) perfringens* gleichen (Ehling-Schulz et al., 2004). Wertvolle statistische Daten lassen sich hierzulande daher nur aus Erhebungen in Gemeinschaftsverpflegungseinrichtungen wie der Bundeswehr gewinnen, welche für die Zeitspanne von 1985 bis 2000 eine relative Zunahme der durch *B. cereus* hervorgerufenen, lebensmittelassozierten Krankheitsausbrüche von 20 % auf mehr als 60 % darlegen (Kleer et al., 2001). Eine 2011 erschienene amerikanische Studie (Scallan et al., 2011) zeigt, dass sich in den USA, im Vergleich zu einer Statistik aus dem Jahre 1999 (Mead et al., 1999), die Anzahl der durch *B. cereus* verursachten Lebensmittelerkrankungen verdoppelt hat. Ein internationaler Vergleich hinsichtlich des Vorkommens der durch *B. cereus* hervorgerufenen

emetischen oder Diarrhoe-Form erscheint trotz etwaiger Tendenzen spekulativ, da diesbezügliche Datenerhebungen schon allein in den europäischen Ländern völlig unterschiedlich geregelt sind.

Die unzulängliche Datenlage hierzulande ist außerdem sicherlich in einer Dunkelziffer begründet, welche aus dem im Allgemeinen milden und kurzen Verlauf der durch *B. cereus* verursachten gastrointestinalen Erkrankungen resultiert. Von der European Food Safety Authority (EFSA) sind sogar bestimmte *B. cereus* Stämme zum Einsatz als Probiotika beim Menschen genehmigt, obwohl fast jeder *B. cereus* Stamm in der Lage ist, zumindest eines der Diarrhoe-Toxine zu produzieren (Guinebretière et al., 2002; Duc le et al., 2004; Hong et al., 2005). Im Kontrast dazu, gibt es auch Berichte über schwerwiegende *B. cereus* bedingte Lebensmittelvergiftungsfälle mit vereinzelt letalem Ausgang (Mahler et al., 1997; Lund et al., 2000; Dierick et al., 2005; Shiota et al., 2010; Naranjo et al., 2011).

2.1 Gastrointestinale Krankheitsbilder

Bei dem durch *B. cereus* verursachten emetischen Syndrom handelt es sich um eine klassische Lebensmittelintoxikation, deren verursachendes Toxin, das sogenannte Cereulid, in der Regel präformiert im Lebensmittel vorliegt. Bereits nach einer Inkubationszeit von 0,5 bis 6 Stunden treten erste Krankheitssymptome in Form von Nausea und Vomit auf, welche in der Regel nach einer Krankheitsdauer von 6 bis 24 Stunden wieder abklingen (Ehling-Schulz et al., 2004).

Die von profusem Durchfall und abdominalen Schmerzen geprägte Diarrhoe-Form dagegen, ist Folge einer durch *B. cereus* hervorgerufenen Lebensmittelinfektion. Es wird angenommen, dass infolge des Verzehrs von mit vegetativen Bakterienzellen oder Sporen kontaminierten Lebensmitteln, die verantwortlichen Enterotoxine bei diesem Krankheitsbild in toxischer Dosis erst im Dünndarm gebildet werden (Andersson et al., 1998; Clavel et al., 2004). Bis zum Auftreten entsprechender Symptome vergeht eine Inkubationszeit von 8 bis 16 Stunden. Die Erkrankungsdauer selbst ist verhältnismäßig kurz und liegt zwischen 12 und 24 Stunden (Stenfors Arnesen et al., 2008). Neben dem Menschen sind auch Hunde und Katzen für die durch *B. cereus* verursachte Diarrhoe-Form empfänglich. Bei oraler Aufnahme von mit *B. cereus* belasteter Tiernahrung traten ähnliche gastrointestinale Symptome auf wie beim Menschen (Nikodémusz, 1965; Nikodémusz & Gonda, 1966; Nikodémusz, 1967).

2.2 Extraintestinale Krankheitsbilder

Ergänzend ist zu erwähnen, dass *B. cereus* neben den beschriebenen gastrointestinalen Krankheiten ebenfalls zahlreiche extraintestinale Erkrankungen verursachen kann (Drobniewski, 1993; Bottone, 2010). Diese lassen sich beim Menschen grob in systemische und lokale Infektionen unterteilen. Zu Ersteren zählen unter anderem Bakteriämien und Septikämien (Hilliard et al., 2003; Ginsburg et al., 2003), zentralnervöse Infektionen (Tokieda et al., 1999; Gaur et al., 2001; Lequin et al., 2005), Infektionen des Atemapparats (Frankard et al., 2004; Hoffmaster et al., 2006; Katsuya et al., 2009), Endokarditiden (Steen et al., 1992; Castedo et al., 1999; Thomas et al., 2012) und Harnwegsinfektionen (Sato et al., 1998).

Lokale Erkrankungen umfassen beispielsweise Wundinfektionen (Dubouix et al., 2005) sowie schwerwiegende und folgenschwere Infektionen des Auges. Hierbei sind insbesondere Endophthalmitiden (Beecher et al., 2000; Callegan et al., 2007; Moyer et al., 2008; Callegan et al., 2011) anzuführen, welche ohne adäquate Therapie zu Sehverlust oder sogar Verlust des Auges führen können (Davey & Tauber, 1987; Das et al., 2001), aber auch Keratitis u. a. im Zusammenhang mit dem Tragen von Kontaktlinsen (Pinna et al., 2001). Von extraintestinalen Erkrankungen sind besonders häufig immunsupprimierte und immuninkompetente Personen, Frühgeborene bzw. Neugeborene, Intensivpatienten mit Verweilkathetern und Drogenabhängige betroffen (Drobniewski, 1993; Kotiranta et al., 2000; Van Der Zwet et al., 2000; Hernaiz et al., 2003; Uchino et al., 2012); letztere auffallend gehäuft nach intravenöser Drogenapplikation, aber auch infolge subkutan ins Fettgewebe und intramuskulär injizierten kontaminierten Heroins (Dancer et al., 2002). Schwere Krankheitsverläufe mit letalem Ausgang sind möglich.

Auch im Bereich der Veterinärmedizin zeigt sich *B. cereus* als auslösendes Agens zum Teil gravierender extraintestinaler Erkrankungen. Problematisch sind zum einen die bereits in den 1950er Jahren beschriebenen Euterentzündungen beim Rind (Brown & Scherer, 1957; Terplan, 1957), welche nicht nur subklinisch verlaufen, sondern vor allem in Form einer akuten Mastitis schwere Allgemeinstörungen bis hin zu tödlichem Verlauf verursachen können (Gedek, 1986; Schiefer et al., 1976; Parkinson et al., 1999). In der Vergangenheit traten diverse Fälle infolge intramammärer Applikation kontaminierter Trockenstellpräparate oder Antibiotika auf (Ewald et al., 1985; Gedek, 1986; Schiefer et al., 1976). Zum anderen wurde *B. cereus* in Verbindung mit Aborten bei Rindern und Schafen (Schuh & Weinstock, 1985; Rowan et al., 2003), Pferden (Ranganatha et al., 1981), Schweinen (Kirkbride et al.,

1986) und Kamelen (Wernery et al., 1996) isoliert.

3 *Bacillus cereus* als Verursacher gastrointestinaler Erkrankungen

3.1 Potentielle Virulenzfaktoren im Überblick

Als Auslöser der durch *B. cereus* verursachten gastrointestinalen Erkrankungen wurden in der Vergangenheit zahlreiche Virulenzfaktoren diskutiert. Schon früh wurden diverse Proteine, wie z. B. Cereolysin O (Kreft et al., 1983), verschiedene Phospholipasen C (Kuppe et al., 1989), Hämolysin II (HlyII) (Baida et al., 1999), Hämolysin III (Baida & Kuzmin, 1995) oder Enterotoxin T (BceT) (Agata et al., 1995a) und Enterotoxin FM (EntFM) (Asano et al., 1997) als Pathogenitätsfaktoren untersucht. Letztgenanntes Protein scheint an der Virulenz von *B. cereus* vermutlich als potentielle Zellwandpeptidase beteiligt, weshalb Tran et al. (2010) eine Umbenennung von EntFM in CwpFM (Cell wall peptidase FM) vorschlugen.

Heute stehen vier relevante Toxine bzw. Enterotoxinkomplexe fest, welche als Hauptverursacher der Erkrankungen mit den Leitsymptomen Emesis und Diarrhoe verantwortlich zeichnen (Tabelle 2). Während die emetische Form durch das Einzeltoxin Cereulid (Agata et al., 1995b) ausgelöst wird, kann die Diarrhoe-Form ebenfalls durch ein Einzeltoxin, das Cytotoxin K (CytK) (Lund et al., 2000), sowie durch zwei aus jeweils drei Proteinen bestehende Enterotoxinkomplexe, nämlich Hämolysin BL (Hbl) (Beecher et al., 1995) und Non-haemolytic Enterotoxin (Nhe) (Lund & Granum, 1996), hervorgerufen werden.

**Tabelle 2. *B. cereus*-bedingte gastrointestinale Erkrankungen:
wichtigste Einzeltoxine bzw. Toxinkomplexe**

Einzeltoxin/ Toxin-Komplex	Molekulargewicht (kDa)	Biologische Aktivität nachgewiesen in	Referenz
Cereulid	1,2	CT ¹	Agata et al. (1994)
CytK	34,0	CT	Lund et al. (2000)
Hbl (-B, -L ₁ , -L ₂)	38,0; 39,5; 43,0 37,8; 38,5; 43,2 38,1; 39,5; 44,8	RIL ² , VPR ³ , MLT ⁴ , CT	Thompson et al. (1984) Beecher et al. (1995) Beecher & Wong (2000b)
Nhe (A, B, C)	45,0; 39,0; 105,0 41,0; 39,8; 36,5	CT	Lund & Granum (1996) Granum et al. (1999)

¹ CT, Cytotoxicity test; ² RIL, Rabbit ileal loop test; ³ VPR, Vascular permeability reaction; ⁴ MLT, Mouse lethality test.

In den letzten Jahren wurde neben den klassischen Enterotoxinen vermehrt die Bedeutung der von *B. cereus* zusätzlich exprimierten Virulenzfaktoren InhA1, NprA und HlyII untersucht, um diese möglicherweise als Marker zur Unterscheidung pathogener von nicht-pathogenen *B. cereus*-Stämmen heranziehen zu können. *HlyII* konnte hierbei nur in einigen pathogenen Erregerstämmen nachgewiesen werden, und die Expression der Metalloproteasen-Gene *inhA1* und *nprA* erwies sich in pathogenen Stämmen höher als in Nicht-pathogenen (Cadot et al., 2010). *HlyII*, welches wie CytK zu den „ β -barrel“-porenbildenden Toxinen gehört, induzierte *in vitro* und *in vivo* Apoptose in phagozytischen Zellen wie den Makrophagen (Tran et al., 2011). Interessanterweise scheint die Regulation dieser drei Faktoren unabhängig vom *Cereus*-Gruppen-spezifischen pleiotropen Transkriptionsregulator PlcR (Phospholipase C Regulator) zu sein (Näheres siehe unter 3.3.1).

Neuere von Clair et al. (2010) durchgeführte Proteom-Studien zum Sekretom des *B. cereus sensu stricto*-Typstamms ATCC 14579 zeigten, dass dieser im Gegensatz zu früheren Annahmen in der Lage ist, alle relevanten Diarrhoe-verursachenden Enterotoxine zu produzieren. Neben CytK, den drei Komponenten des Hbl-Komplexes, sowie NheA und NheB, wurde erstmals auch die dritte Nhe-Komponente NheC nachgewiesen. Im Rahmen dieser Studie wurden für ATCC 14579 einundreißig neue potentielle Virulenzfaktoren gefunden. Erwähnenswert sind außerdem eine mutmaßliche vierte Hbl-Komponente (HblB'),

EntFM, HlyII und drei neue mögliche Enterotoxine, für welche zunächst die Bezeichnungen EntA, EntB und EntC vorgeschlagen wurden.

3.2 Emetisches Toxin – Cereulid

Das durch *B. cereus* hervorgerufene emetische Syndrom wird durch das hitze-, säure- und proteolyseresistente Toxin Cereulid verursacht (Agata et al., 1994; Shinagawa et al., 1996; Rajkovic et al., 2008), welches bereits präformiert im Lebensmittel vorliegt, womit auch die relativ kurze Inkubationszeit von 0,5 bis 6 Stunden (Ehling-Schulz et al., 2004) zu erklären ist. Neuere Studien zeigten für Cereulid fungistatische Wirksamkeit auf, was einer effektiveren Ansiedlung von emetischen *B. cereus*-Stämmen in der Umgebung bzw. Lebensmitteln nützlich sein könnte (Ladeuze et al., 2011). Als hydrophobes zyklisches Dodekadepsipeptid mit der Strukturformel $[D-O-Leu-D-Ala-D-O-Val-D-Val]_3$, weist Cereulid (1191 Da) große strukturelle und funktionelle Ähnlichkeiten mit dem von *Streptomyces spp.* produzierten Makrolid-Antibiotikum Valinomycin, einem Kaliumionophor, auf (Agata et al., 1994). Aufgrund der ionophoretischen Eigenschaften kommt es zu einer Beeinträchtigung des Membranpotentials der Mitochondrien, zu einem Anschwellen der Mitochondrien und zu einer Vakuolenbildung von Hep-2-Zellen (Mikkola et al., 1999; Agata et al., 1994; Agata et al., 1995b). Paananen et al. (2002) konnten außerdem eine immunsuppressive Wirkung durch Hemmung humaner natürlicher Killerzellen (T-Zellen) beobachten. Neben deren Zytokinproduktion war auch deren zytotoxische Aktivität durch das emetische Toxin herabgesetzt. Nach derzeitigem Verständnis bindet Cereulid nach der Magenpassage im Dünndarm an 5-HT₃-Serotonin-Rezeptoren, was in einer Stimulierung der Vagusafferenzen resultiert und anschließend Erbrechen auslöst (Agata et al., 1995b).

Die Synthese des emetischen Toxins erfolgt enzymatisch durch eine nichtribosomale Peptidsynthetase (NRPS) (Horwood et al., 2004; Ehling-Schulz et al., 2005; Magarvey et al., 2006). Letztere wird durch einen 24 kb Cereulid-Synthetase (*ces*)-Gen-Cluster codiert, welcher wiederum auf einem (*B. anthracis*-) pXO1-ähnlichen Megaplasmid lokalisiert ist (Ehling-Schulz et al., 2006a). Die Cereulid-Expression setzt die Aktivität der Sporulations- bzw. Transkriptionsfaktoren Spo0A und AbrB voraus, und ist damit unabhängig vom Phospholipase C-Regulator (PlcR), welcher bei den Enterotoxinen als Transkriptionsfaktor eine entscheidende Rolle spielt (Lücking et al., 2009).

In diversen molekularbiologischen Studien besaßen lediglich 0 bis 8 % der beteiligten *B. cereus*-Stämme die entsprechenden *ces*-Gene (Yang et al., 2005; Ehling-Schulz et al., 2006b; Ouoba et al., 2008).

3.3 Enterotoxine – CytK, Hbl und Nhe

3.3.1 Regulation der Toxinexpression und Sekretion der Toxine

Die als wichtigste Auslöser des durch *B. cereus* verursachten diarrhoeischen Syndroms geltenden Enterotoxinkomplexe Hämolysin BL (Hbl) und Non-haemolytic Enterotoxin (Nhe), sowie das Einzeltoxin Cytotoxin K (CytK), werden in toxischer Dosis erst im Dünndarm produziert. Die Expression der Enterotoxine wird analog zum emetischen Toxin in Abhängigkeit von Wachstumsphase bzw. -zyklen sowie von Umgebungseinflüssen durch verschiedene interagierende Regulatoren gesteuert (Gohar et al., 2008; Lücking et al., 2009). Umgebungsfaktoren wie Nährstoffangebot, Temperatur, pH-Wert, Sauerstoff- und Kohlendioxidkonzentration, etc., bestimmen die Höhe der Toxin-Expression maßgeblich mit (Spira & Silverman, 1979; Garcia-Arribas & Kramer, 1990; Sutherland & Limond, 1993; Fermanian et al., 1997; Rowan & Anderson, 1998; Mahakarnchanakul & Beuchat, 1999; Beattie & Williams, 2002; Duport et al., 2004; Duport et al., 2006; Zigha et al., 2006; Thomassin et al., 2006; Ouhib-Jacobs et al., 2009; van der Voort & Abee, 2009; Ceuppens et al., 2011).

Die Transkription der *cytK*-, *hbl*- und *nhe*-Gene unterliegt der Kontrolle des (mit Ausnahme von *B. anthracis*) *Cereus*-Gruppen-spezifischen pleiotropen Transkriptionsregulators PlcR. Dieser ist Teil eines Quorum-Sensing-Systems und wird somit in Abhängigkeit von der erforderlichen Zelldichte durch das autoinduzierte Signalpeptid PapR aktiviert, welches dem PlcR die Bindung an spezifische palindrome DNA-Sequenzen (PlcR-Boxen) im Bereich der Promotorregionen der von diesem regulierten Gene erleichtert. PlcR selbst ist positiv autoinduziert, wird zu Beginn der stationären Phase maximal exprimiert und durch den *Bacillus* spp.-Sporulationsfaktor Spo0A gehemmt (Lereclus et al., 1996; Agaisse et al., 1999; Lereclus et al., 2000; Slamti & Lereclus, 2002; Declerck et al., 2007; Gohar et al., 2008). Die Expression der Enterotoxinkomplexe Hbl und Nhe wird außerdem unter anaeroben Verhältnissen durch das Redox-empfindliche Zwei-Komponenten-System ResDE (Duport et al., 2006; Esbelin et al., 2009) zusätzlich hochreguliert und unabhängig vom Sauerstoffgehalt

durch den Redox-Regulator Fnr (Fumarat/Nitrat-Regulator) kontrolliert (Zigha et al., 2007; Esbelin et al., 2008; Messaoudi et al., 2010). In einer aktuellen Studie wurde für den pleiotropen Regulator CodY gezeigt, dass er eine Schlüsselrolle hinsichtlich einer für *B. cereus* effizienten Toxinexpression einnimmt. Dieser reguliert vermutlich nicht nur die Transkription der *cytK*-, *hbl*- und *nhe*-Gene direkt, sondern vermutlich auch indirekt über eine Hochregulierung der PlcR-Expression (Lindbäck et al., 2012).

Unter natürlichen Bedingungen sezerniert *B. cereus* die Enterotoxine als klassische Exoproteine. Die Sekretion der einzelnen CytK-, Hbl- und Nhe-Toxine erfolgt nach neueren Untersuchungen über den Sec-Translokations-Weg und ist im Wesentlichen abhängig von einer intakten Sec-artigen Signalpeptidsequenz (Fagerlund et al., 2010). Dieser Sec-Weg wird wie bei *E. coli* im Wesentlichen durch die multimere Sec-Translokase gebildet, bestehend aus einem membranständigen, heterotrimeren SecYEG-Proteinkomplex sowie der zytosolischen ATPase SecA, welche die Energie für den Translokationsprozess liefert (de Keyzer et al., 2003). Das Signalpeptid aus 18 bis 35 Aminosäuren, auch Leadersequenz genannt, unterscheidet Exoproteine von zytoplasmatischen Proteinen und bewirkt deren Ausschleusung aus der Bakterienzelle (Simonen & Palva, 1993). Es befindet sich in Verlängerung des aminoterminalen Endes des Präproteins und besteht in seiner Struktur zentral aus einem hydrophoben Abschnitt, mit positiv geladenem N-Terminus, sowie einer C-terminal polaren Region mit Signalpeptidaseschnittstelle (von Heijne, 1985). Da eine im Zytoplasma bereits fertig ausgebildete Tertiärstruktur die Translokation von Exoproteinen unmöglich machen würde, verbleiben die Präproteine mit Hilfe von sogenannten Chaperonen in teilweise ungefaltetem Zustand (Simonen & Palva, 1993). Chaperone sind lösliche Proteine, welche nicht nur die translokationskompetente Konformation von Vorläuferproteinen aufrechterhalten können, sondern generell die korrekte Faltung neu synthetisierter Exoproteine unterstützen. Zwischen Signalpeptid und dem eigentlichen Protein weisen *Bacillus*-Spezies zudem oft eine zusätzliche Prodomäne bzw. ein Propeptid auf, für welches unter anderem ebenfalls eine Beeinflussung der Translokation, der Sekretion oder auch der Faltung der Proteine diskutiert wird (Simonen & Palva, 1993). Im Anschluss an die Ausschleusung des Vorläuferproteins über den Sec-Translokationsweg wird dessen Leadersequenz durch eine Signalpeptidase abgespalten (Fagerlund et al., 2010).

3.3.2 Cytotoxin K (CytK)

Im Gegensatz zu den aus drei Komponenten bestehenden Enterotoxinkomplexen Hbl und Nhe, handelt es sich bei Cytotoxin K (CytK) um ein einzelnes Exoprotein mit einem Molekulargewicht von 34 kDa. Erstmals wurde CytK im Jahre 2000 aus dem 1998 für eine schwere Lebensmittelinfektion verantwortlichen *B. cereus*-Stamm NVH 391/98 isoliert und sequenziert, welcher trotz scheinbar fehlender Hbl- und Nhe-Produktion Auslöser nekrotischer Enteritiden war. Erkrankte Personen entwickelten teils blutige Durchfälle, drei Menschen starben (Lund et al., 2000). Später gelang es Fagerlund et al. (2007) zu zeigen, dass NVH 391/98 eine modifizierte Form des *nhe*-Operons besitzt, welche im Durchschnitt zu 80 % mit der Originalsequenz übereinstimmt, womit CytK möglicherweise doch nicht alleinverantwortlich für die Pathogenität des *B. cereus*-Stamms NVH 391/98 sein könnte. Während hier bereits dessen Expression von NheB nachgewiesen werden konnte, gelang Tsilia et al. (2012) zum ersten Mal zusätzlich der Nachweis von NheA. CytK gehört zur Gruppe der sogenannten „ β -barrel pore forming toxins“ und weist Sequenzhomologien zu *B. cereus*-Hämolysin II (HlyII) (Baida et al., 1999), *S. aureus*-Leukozidin bzw. dessen α - und γ -Hämolysin, sowie dem β -Toxin von *C. perfringens* auf (Lund et al., 2000). *In vitro*- und *in vivo*-Studien zeigten, dass CytK an Doppellipidschichten Kanäle bildet, im Zellkulturtest toxisch gegenüber Vero-Zellen und humanen intestinalen Caco-2-Zellen ist, sowie hämolytische und nekrotische Eigenschaften besitzt (Lund et al., 2000; Hardy et al., 2001). CytK kann in zwei verschiedenen Varianten auftreten: CytK-1 und CytK-2. CytK-2 wurde in Hbl- und/oder Nhe-produzierenden *B. cereus*-Stämmen gefunden und stimmte zu 89 % mit der Aminosäuresequenz des im Vergleich deutlich zytotoxischeren CytK-1 überein (Stenfors & Granum, 2001; Fagerlund et al., 2004), welches dem originären CytK entspricht. Im Gegensatz zu relativ häufig vorkommenden CytK-2-Produzenten (Guinebretière et al., 2006; Fagerlund et al., 2007; Samapundo et al., 2011), konnte das Gen für CytK-1 bis heute nur in drei *B. cereus*-Stämmen nachgewiesen werden, welche alle drei zusätzlich die Variante des *nhe*-Operons besitzen (Fagerlund et al., 2007; Auger et al., 2008). Diese kleine Gruppe mit dem zugehörigen Referenz- bzw. Typstamm NVH 391/98, gehört der seit kurzem offiziell anerkannten, thermotoleranten Spezies *B. cytotoxicus* an (Guinebretière et al., 2013).

3.3.3 Hämolyisin BL (Hbl)

Die drei Proteinkomponenten Hbl-B (38,1 kDa), Hbl-L₁ (39,5 kDa) und Hbl-L₂ (44,8 kDa) bilden den hämolytisch wirksamen *B. cereus*-Enterotoxinkomplex Hbl, welcher als Erster vollständig charakterisiert wurde (Thompson et al., 1984; Beecher & Macmillan, 1991; Beecher & Wong, 2000b). Den ersten Hbl-Nachweis erbrachten Beecher & MacMillan (1990) für *B. cereus*-Stamm F837/76, welcher 1976 in Verbindung mit einer postoperativen Wundinfektion isoliert worden war (Turnbull et al., 1979; Auger et al., 2012). Die einzeln atoxischen Proteinkomponenten werden unabhängig voneinander sezerniert und müssen zur Erzielung maximaler biologischer Aktivität alle drei gleichzeitig in einem Mengenverhältnis von 1:1:1 vorhanden sein (Beecher et al., 1995; Dietrich et al., 1999; Lindbäck et al., 2004). Enterotoxin-Charakteristika wurden unter anderem in Tierversuchen mittels Mausletalitätstest (MLT), Erhöhung der Kapillarpermeabilität (VPR) und Darmschlingenligationstest (RIL), einem klassischen Test für Diarrhoe-Toxine, gezeigt (Bergdoll, 1988; Beecher & Wong, 1994b; Beecher et al., 1995). Außerdem besitzt Hbl zytotoxisches Potential gegenüber Vero-Zellen (Lund & Granum, 1997) und bildet eine ringförmige diskontinuierliche Hämolyse auf Schafblutagar (Beecher & MacMillan, 1990; Beecher & Macmillan, 1991). Dieses paradoxe Zonenphänomen, bei welchem Hämolyse zunächst weiter entfernt von der Auftragsstelle und erst später unmittelbar um diese herum stattfindet, wird scheinbar von zwei durch *B. cereus* gebildeten Enzymen (Sphingomyelinase und Phospholipase C) beeinflusst (Beecher & Wong, 1997; Beecher & Wong, 2000a). Als phänotypisches Unterscheidungsmerkmal lässt es sich jedoch nur bedingt heranziehen, da es nicht bei allen Hbl-positiven Stämmen auftritt (in't Veld et al., 2001).

Zum Wirkmechanismus von Hbl auf zellulärer Ebene wurden von der Arbeitsgruppe um Beecher & Wong zwei unterschiedliche Hypothesen entwickelt. In früheren Arbeiten (Beecher & Macmillan, 1991) wurde die Bindung von Hbl-B an die Zelloberfläche mit anschließender Einschleusung der beiden L-Komponenten in die Zelle postuliert. Später wurde ein zweites mögliches Modell entwickelt, wonach die drei Hbl-Komponenten unabhängig voneinander an die Zielzelle binden, zu einem „membrane attack complex“ auf der Zelloberfläche oligomerisieren, welcher transmembranäre Poren bildet und schließlich aufgrund kolloidosmotischer Mechanismen zum Austreten von Zellmaterial bis hin zum Zelltod führt (Beecher & Wong, 1997).

Madegowda et al. (2008) schlossen aus der Röntgenstrukturanalyse von Hbl-B (PDB ID:

2nrj), welches große Strukturähnlichkeiten zu *E. coli* Hämolysin E (HlyE) bzw. Cytolysin A (ClyA) (PDB ID: 1qoy) aufweist (Wallace et al., 2000), auf eine analoge Wirkungsweise der Bindungsdomäne bzw. ein gleichartiges Porenbildungsverhalten.

Die entsprechenden Gene für Hbl-B (*hblA*), -L₁ (*hblD*) und -L₂ (*hblC*) liegen alle auf dem gleichen Operon und werden in der Reihenfolge *hblC*, *hblD* und *hblA* in eine mRNA transkribiert (Heinrichs et al., 1993; Ryan et al., 1997). Unterhalb von *hblCDA* ist ein weiteres Gen lokalisiert (*hblB*), welches große Sequenzhomologien mit *hblA* aufweist, bisher jedoch für ein Pseudogen gehalten wurde, da es nicht in nachweisbaren Mengen transkribiert wurde (Lindbäck et al., 1999; Okstad et al., 1999; Stenfors Arnesen et al., 2008). Clair et al. (2010) konnten in neueren Studien bezüglich des *B. cereus* ATCC 14579 Sekretoms jedoch erstmals zeigen, dass als Genprodukt von *hblB* eine vierte Hbl-Komponente (Hbl-B') exprimiert wird. Die Rolle des Hbl-B' ist noch ungeklärt. Die Transkription von *hblB* erfolgt einzeln, unabhängig vom PlcR-regulierten *hblCDA*, und führt zu einer von Sauerstoff- und Redoxbedingungen unabhängigen Sekretion des Hbl-B'. Da Hbl-B' möglicherweise dieselbe Funktion erfüllt wie Hbl-B, liegt die Vermutung nahe, dass Hbl-B' in bestimmten Wachstumsstadien oder unter bestimmten Wachstumsbedingungen die Funktion des Hbl-B ergänzen oder verstärken könnte (Clair et al., 2010).

In molekularbiologischen Studien wiesen ca. 40 bis 80 % der untersuchten *B. cereus*-Stämme Gene für Hbl auf (Hansen & Hendriksen, 2001; in't Veld et al., 2001; Guinebretière et al., 2002; Thaenthanee et al., 2005; Yang et al., 2005; Ehling-Schulz et al., 2006b; Wijnands et al., 2006; Aragon-Alegro et al., 2008; Ngamwongsatit et al., 2008b; Ouoba et al., 2008; Wehrle et al., 2009).

3.3.4 Non-haemolytic Enterotoxin (Nhe)

Infolge einer 1995 in Norwegen aufgetretenen Lebensmittelinfektion wurde der Hbl- und CytK-negative *B. cereus* Stamm NVH 0075/95 isoliert, mittels welchem erstmals auch das Nonhaemolytic Enterotoxin (Nhe) als Diarrhoe-verursachendes Enterotoxin identifiziert werden konnte (Lund & Granum, 1996). Wie Hbl stellt auch Nhe einen aus drei Komponenten bestehenden Enterotoxinkomplex dar (Lund & Granum, 1996; Lund & Granum, 1997), dessen Gene ebenfalls alle auf einem Operon liegen (Granum et al., 1999). Zunächst wurde fälschlicherweise neben NheA (41,0 kDa) und NheB (39,8 kDa) ein

105 kDa-Protein für einen Teil des Enterotoxinkomplexes gehalten, welches sich später jedoch als Kollagenase herausstellte (Lund & Granum, 1999). Sequenzierungen zeigten, dass das Operon ein weiteres Nhe-Gen (*nheC*) aufweist, das die tatsächliche dritte Komponente des Nhe-Komplexes, NheC (36,5 kDa), kodiert. (Granum et al., 1999).

Tabelle 3 veranschaulicht, dass die Aminosäuresequenzen der drei Nhe-Komponenten sowohl untereinander, als auch im Vergleich zu denen des Hbl-Enterotoxinkomplexes große Ähnlichkeiten aufweisen; vor allem zwischen NheB und Hbl-L₁ bzw. NheC und Hbl-B (Ryan et al., 1997; Granum et al., 1999; Fagerlund et al., 2008). Nhe weist im Gegensatz zu Hbl keine Hämolyse auf Rinderblutagar auf (Lund & Granum, 1996), eine Eigenschaft, die für die Namensgebung herangezogen wurde. Die Ergebnisse auf bovinem Blutagar sind möglicherweise aber in einer im Vergleich zu Hbl schwächeren hämolytischen Wirkung des Nhe begründet (Stenfors Arnesen et al., 2008). In Suspensions-Assays konnte schließlich nachgewiesen werden, dass Nhe nicht nur zytolytisch wirksam ist, sondern auch hämolytisch gegenüber diversen Säugetier-Erythrozyten (Fagerlund et al., 2008). Nach Fagerlund et al. (2008) handelt es sich bei Nhe um ein porenbildendes Toxin, welches nach der Insertion in die Zellmembran die kolloidosmotische Lyse von Epithelzellen bewirkt und sowohl strukturelle als auch funktionelle Ähnlichkeiten zu Hämolysinen (z. B. ClyA) gramnegativer Bakterien besitzt.

Tabelle 3. Sequenzhomologien der Proteinkomponenten der von *B. cereus* ATCC 14579 produzierten Hbl- und Nhe-Komplexe bzw. im Vergleich zu von *E. coli* K-12 produziertem Cytolysin A (ClyA), nach Fagerlund et al. (2008)

	Hbl-L ₂	Hbl-L ₁	Hbl-B	NheA	NheB	NheC
ClyA	18 %	20 %	20 %	18 %	19 %	20 %
Hbl-L ₂		18 %	23 %	23 %	21 %	19 %
Hbl-L ₁			25 %	18 %	40 %	32 %
Hbl-B				20 %	27 %	25 %
NheA					22 %	22 %
NheB						44 %

Aufgrund der Sequenzhomologien wurden anhand des bereits oben erwähnten per Röntgenstrukturanalyse ermittelten Hbl-B Modells (PDB ID: 2nrj) (Madegowda et al., 2008) hypothetische Strukturmodelle für NheB und NheC per Computer generiert (Fagerlund et al., 2008) (Abbildung 1). Entsprechend der festgestellten röntgenstrukturanalytischen Übereinstimmungen in der Tertiärstruktur zwischen Hbl-B und ClyA (PDB ID: 1qoy) (Wallace et al., 2000) zeigen auch NheB und NheC im entworfenen 3D-Homologiemodell die gleichartige Ausrichtung der vier langen α -Helices sowie die bei diesen Proteinen einzigartig vorkommende Subdomäne mit einer β -Haarnadelstruktur, welche von zwei kurzen α -Helices flankiert wird. Auch im Falle von NheB und NheC entsprechen die hydrophoben Segmente der berechneten β -Haarnadelstruktur. Angesichts der ihnen gemeinsamen einzigartigen Strukturen und damit verbundenen funktionellen Gemeinsamkeiten postulierten Fagerlund et al. (2008), dass Nhe, Hbl und ClyA eine neue Superfamilie porenbildender Toxine darstellt.

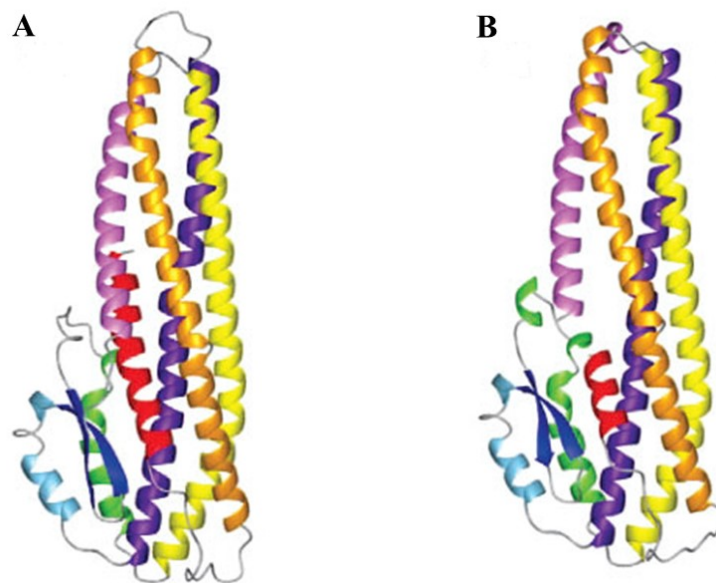


Abbildung 1. Computergenerierte Homologiemodelle für NheB (A) und NheC (B) nach Fagerlund et al. (2008). Dunkelblau: hydrophobe β -Haarnadelstruktur.

Untersuchungen zum zellulären Wirkmechanismus zeigten zytotoxische Eigenschaften des Nhe-Komplexes gegenüber tierischen Vero- und GH4-Zellen, sowie humanen Epithel- und Endothelzellen, wie HUVEC, Hep-2, Caco-2, HepG2, A549 und A204 (Lindbäck et al., 2004; Lindbäck et al., 2010; Haug et al., 2010; Didier et al., 2012). Maximale biologische Aktivität wird bei einem molaren Verhältnis von 10:10:1 der Einzelkomponenten NheA:NheB:NheC erreicht (Lindbäck et al., 2004). Das Vorhandensein von NheC in stöchiometrischem Überschuss ($> 10\%$) wirkt sich blockierend aus (Lindbäck et al., 2010). Welche individuelle Rolle der jeweiligen Enterotoxinkomplex-Komponente zukommt, ist noch nicht endgültig geklärt. Frühere Annahmen, dass NheC lediglich die Funktion einer Art Katalysator zukommt, welcher nach der Bindung von NheB an die Zielzelle NheA und NheB zusammenbringt, oder aber Konformationsänderungen fördert (Lindbäck et al., 2004), konnte durch neuere Studien widerlegt werden. Das aktuelle Modell geht davon aus, dass NheB und NheC gemeinsam an die Zelloberfläche binden, begleitet von Konformationsänderungen und gegebenenfalls auch Oligomerisierung der NheB-Komponente, wodurch letztlich die Bindung von NheA ermöglicht wird und es zur Lyse kommt (Lindbäck et al., 2010; Didier et al., 2012; Phung et al., 2012b). Zellkulturversuche verdeutlichten, dass es einer bestimmten Bindereihenfolge bedarf. Obwohl NheB und NheC in der Lage sind, einzeln direkt an die Zelle zu binden, ist es für einen toxischen Effekt unabdingbar, dass NheC im ersten Inkubationsschritt vorhanden ist. Dies ist entweder als zellbindende Einzelkomponente möglich, der im zweiten Schritt die komplexbildende NheB-Komponente folgt, oder als zuvor in Lösung gebildeter Komplex mit NheB. Wenn NheB und NheC bereits als Komplex mit der Zielzelle in Kontakt treten, resultiert dies in höchstmöglicher Zytotoxizität. Die Komplexkomponente NheA, welche im ersten Inkubationsschritt nicht benötigt wird, ist jedoch im letzten Schritt zwingend erforderlich (Lindbäck et al., 2010). In Neutralisationsversuchen mit monoklonalen Antikörpern gegen NheB (Dietrich et al., 2005; Didier et al., 2012) wurde bekräftigt, dass der für zellgebundenes NheB hochaffinen NheA-Komponente eine Schlüsselrolle als Auslöser der Porenbildung zukommt.

Eine wichtige funktionelle Bedeutung erfüllt hierbei die Aminosäuresequenz am C-Terminus von NheB, welche dem Epitop des monoklonalen Antikörper 1E11 entspricht, der die Bindung von NheA zu blockieren vermag (Didier et al., 2012). Für NheC scheint die angenommene hydrophobe β -Haarnadelstruktur bei der Zellbindung eine wesentliche Rolle zu spielen, jedoch nicht für die NheC-NheB-Interaktion in Lösung (Lindbäck et al., 2010).

Die Vorkommenshäufigkeit der *nhe*-Gene lag bei molekularbiologisch untersuchten *B. cereus*-Isolaten zwischen 90 und 100 % (Guinebretière et al., 2002; Ehling-Schulz et al.,

2006b; Moravek et al., 2006; Ouoba et al., 2008).

3.3.5 Nachweisverfahren für *B. cereus*-Enterotoxine

In Hinblick auf den Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit soll hier nur ein kurzer Überblick zu relevanten Nachweisverfahren der *B. cereus*-Enterotoxine gegeben werden.

Die Pathogenitätsbeurteilung von Isolaten anhand klassischer Tiermodellversuche *in vivo*, wie dem Darmschlingenligationstest und Gefäßpermeabilitätstest bei Kaninchen (Spira & Goepfert, 1972; Glatz et al., 1974) sowie Affenfütterungsexperimenten (Melling et al., 1976), ist heute weitestgehend abgelöst durch *in vitro*-Bioassays. Zum Nachweis der funktionellen biologischen Aktivität von Diarrhoe-Stämmen auf verschiedenen Zelllinien wurden WST- und MTT-Zellkulturtests unter Verwendung von McCoy-, CHO-, Vero-, Caco-2- und Ped-2E9-Zellen etabliert (Jackson, 1993; Buchanan & Schultz, 1994; Seidel et al., 1996; Dietrich et al., 1997; Gray et al., 2005; Ngamwongsatit et al., 2008a).

Nach der vollständigen Sequenzierung der Enterotoxingene von *B. cereus* haben zudem molekularbiologische Methoden basierend auf dem Prinzip der Polymerasekettenreaktion (PCR) an Bedeutung gewonnen (Guinebretière et al., 2002; Yang et al., 2005; Ehling-Schulz et al., 2006b; Yang et al., 2007; Wehrle et al., 2009; Wehrle et al., 2010). Der Nachweis bestimmter vorhandener Toxingene erlaubt jedoch keinen direkten Rückschluss auf die stammabhängig tatsächlich produzierte Toxinmenge. Hinsichtlich CytK und Nhe kann diese nachweislich stark differieren, auch wenn untersuchte Stämme völlig identische Toxingene aufweisen (Dietrich et al., 2005; Moravek et al., 2006; Fagerlund et al., 2007).

Gegenwärtig sind zur Detektion der *B. cereus*-Enterotoxine Hbl und Nhe auf Proteinebene zwei immunchemische Testkits kommerziell erhältlich, welche auf polyklonalen Antikörpern basieren und beide lediglich eine der drei Komponenten des jeweiligen Enterotoxinkomplexes nachweisen können. Während der reverse Latexagglutinationstest BCET-RPLA (Oxoid) vom Nhe-Komplex nur NheA detektiert, wird im Sandwich-Enzymimmuntest BDE-VIA™ (Tecra) nur die L₂-Komponente von Hbl bestimmt. Beide Verfahren sind nur begrenzt als spezifisch zu bezeichnen, da die verwendeten polyklonalen Antikörper auch mit anderen *B. cereus*-Exoproteinen reagieren, was sich insbesondere bei der Untersuchung von Kulturüberständen als problematisch erweist (Beecher & Wong, 1994a; Lund & Granum, 1996). Eine wesentliche Verbesserung der Spezifität immunchemischer Verfahren erzielten Dietrich et al.

(Dietrich et al., 1999; Dietrich et al., 2005) durch die Entwicklung monoklonaler Antikörper gegen alle drei Komponenten des Hbl-Komplexes, gegen die zwei Nhe-Komponenten NheA und NheB, sowie durch die Gewinnung eines polyklonalen (Kaninchen-) Antiserums gegen NheC. Damit gelang die Konstruktion eines sogenannten Kolonieimmunblot-Verfahrens zur Identifikation Hbl- und/oder Nhe-produzierender Kolonien (Moravek et al., 2004). Zudem ist seit 2008 mit der Markteinführung des Duopath®-Systems (Merck) für *B. cereus* der erste auf monoklonalen Antikörpern basierende immunchromatographische Schnelltest verfügbar, mit welchem gleichzeitig der schnelle und sensitive Nachweis sowohl einer Hbl-Komponente (Hbl-L₂), als auch einer Nhe-Komponente (NheB) möglich ist (Krause et al., 2010).

Von wachsendem Interesse sind außerdem die Möglichkeiten der MALDI-TOF/MS, mittels welcher Tsilia et al. (2012) neben NheA und NheB auch der spezifische Nachweis von CytK1 gelang.

III PUBLIKATION

Complex Formation between NheB and NheC Is Necessary to Induce Cytotoxic Activity by the Three-Component *Bacillus cereus* Nhe Enterotoxin

Uta Heilkenbrinker¹, Richard Dietrich¹, Andrea Didier¹, Kui Zhu¹, Toril Lindbäck², Per Einar Granum², and Erwin Märklbauer^{1*}

PLoS ONE

ISBN: 1932-6203

April 2013 | Volume 8 | Issue 4 | e63104

DOI: 10.1371/journal.pone.0063104

Received: December 20, 2012; Accepted: March 28, 2013; Published: April 30, 2013

¹ Department of Veterinary Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Ludwig-Maximilians-Universität München, Schönleutnerstr. 8, 85764 Oberschleissheim, Germany.

² Department of Food Safety and Infection Biology, Norwegian School of Veterinary Science, PO Box 8146 Dep., N-0033 Oslo, Norway.

* Corresponding author. Mailing address:

Ludwig-Maximilians-Universität München,
Schönleutnerstr. 8, 85764 Oberschleissheim, Germany.

Tel: +49 89 2180 78601 Fax: +49 89 2180 78602.

E-mail: e.maertlbauer@mh.vetmed.uni-muenchen.de

ABSTRACT

The nonhemolytic enterotoxin (Nhe) is known as a major pathogenicity factor for the diarrheal type of food poisoning caused by *Bacillus cereus*. The Nhe complex consists of NheA, NheB and NheC, all of them required to reach maximum cytotoxicity following a specific binding order on cell membranes. Here we show that complexes, formed between NheB and NheC under natural conditions before targeting the host cells, are essential for toxicity in Vero cells. To enable detection of NheC and its interaction with NheB, monoclonal antibodies against NheC were established and characterized. The antibodies allowed detection of recombinant NheC in a sandwich immunoassay at levels below 10 ng ml⁻¹, but no or only minor amounts of NheC were detectable in natural culture supernatants of *B. cereus* strains. When NheB- and NheC-specific monoclonal antibodies were combined in a sandwich immunoassay, complexes between NheB and NheC could be demonstrated. The level of these complexes was directly correlated with the relative concentrations of NheB and NheC. Toxicity, however, showed a bell-shaped dose-response curve with a plateau at ratios of NheB and NheC between 50:1 and 5:1. Both lower and higher ratios between NheB and NheC strongly reduced cytotoxicity. When the ratio approached an equimolar ratio, complex formation reached its maximum resulting in decreased binding of NheB to Vero cells. These data indicate that a defined level of NheB-NheC complexes as well as a sufficient amount of free NheB is necessary for efficient cell binding and toxicity. Altogether, the results of this study provide evidence that the interaction of NheB and NheC is a balanced process, necessary to induce, but also able to limit the toxic action of Nhe.

Keywords

Bacillus cereus, nonhemolytic enterotoxin, enteropathogenicity, monoclonal antibodies, enzyme immunoassay, complex formation, mode of action

INTRODUCTION

Bacillus cereus is known as a causative agent of two different types of food poisoning (for reviews, see references [1,2]), which are characterized by either emesis or diarrhea. Whereas the emetic type of food poisoning is caused by a heat-stable cyclic peptide (cereulide, [3]), the diarrheal type has conventionally been related to cytotoxin K, a single protein [4], as well as to two enterotoxin complexes, each consisting of three different exoproteins. Hemolysin BL (Hbl) was first described in 1994 and contains the protein components B (37.5 kDa), L1 (38.2 kDa), and L2 (43.5 kDa) [5,6]. Shortly after, the nonhemolytic enterotoxin (Nhe) was identified in the cytotoxic *B. cereus* strain NVH 0075/95 lacking Hbl, isolated after a large food-poisoning outbreak in Norway [7]. Sequencing and characterization of the *nhe* genes of *B. cereus* strain NVH 1230/88, responsible for another food-poisoning outbreak in Norway [8], revealed that the genes encoding the three protein components NheA (41.0 kDa), NheB (39.8 kDa) and NheC (36.5 kDa) are transcribed as an operon [9,10]. Comparison of the individual components of both Nhe and Hbl showed a significant degree of sequence homology within each complex as well as between the Nhe and Hbl proteins [11]. Based on sequence homology to Hbl-B, for which the X-ray crystal structure has been established [12], homology modeling of both NheB and NheC indicated a mainly α -helical structure with a hydrophobic β -tongue and overall strong similarities to ClyA [11], a cytolysin forming α -helical pores [13].

Nhe acts as a pore-forming toxin with a specific binding order of the three components [14], in which the presence of NheC is mandatory in the priming step. NheA is obligatory in the final step and triggers toxicity by a so far unknown mechanism. NheB binds to cell membranes independently of the other components. However, a fully active toxin complex is formed only when NheB is applied together with NheC or after cell priming with NheC. Interaction between NheB and NheC seems to occur in solution before cell binding [10,14], and the optimum molar ratio between NheA, NheB and NheC is near 10:10:1. If, however, an equimolar concentration of NheC is added to a solution containing NheA and NheB, a complete inhibition of cytotoxic effects will occur [10].

Considering that NheC is able to interact with NheB in solution and that toxic activity of Nhe is inhibited when NheC exceeds a critical “threshold concentration”, we assumed that NheC may form a complex with NheB, which could have an enhancing as well as a limiting effect on the mode of action of Nhe. To prove this hypothesis, we completed the set of antibodies available against Nhe components [15] by preparing monoclonal antibodies against

NheC. The results obtained using these new analytical tools provided insight into the complex formation between NheB and NheC, their functional consequences and allowed compiling of a more detailed model for the initial step of pore formation by the nonhemolytic enterotoxin of *B. cereus*.

MATERIALS AND METHODS

Ethics Statement

Immunizations of mice for generating monoclonal antibodies were conducted in compliance with the German Law for Protection of Animals. Study permission was obtained by the Government of Upper Bavaria (permit number 55.2-1-54-2531.6-1-08).

B. cereus Strains, Culture Medium, and Culture Conditions

B. cereus reference strains used in this study were NVH 1230/88 (producing Nhe, Hbl and CytK; [8]), NVH 0075/95 (producing Nhe; [7]), MHI 1761 (producing NheB and NheC; [14]) and MHI 1672 (producing NheA and NheB; [14]) as well as the *B. cytotoxicus* NVH 0391/98 (producing cytotoxin K; [4,16]). For toxin production *B. cereus* was grown in casein hydrolysate glucose yeast (CGY) medium supplemented with 1% glucose and treated as described previously [14]. Wild-type NheB was purified from 5- to 6-h culture supernatants of MHI 1672 by immunoaffinity chromatography (IAC), and purity was documented by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) [15]. The histidine-tagged recombinant NheA (rNheA) [17] was expressed in *E. coli*, grown in Luria-Bertani (LB) medium supplemented with the required antibiotic.

Expression of Recombinant NheC (rNheC)

A plasmid containing histidine-tagged *nheC* from *B. cereus* strain NVH 1230/88 [10] was used to transform *E. coli* BL21(DE3)pLysS (Novagen, Germany). For toxin production, cells were grown in LB medium supplemented with glucose, ampicillin (50 $\mu\text{g ml}^{-1}$) and chloramphenicol (34 $\mu\text{g ml}^{-1}$) with shaking at 37°C for 17 h. 10% of the overnight culture was transferred to fresh LB medium with the corresponding additives, shaken at 37°C until

reaching an OD₆₀₀ of 0.5–0.6 followed by 1 mM IPTG induction for 4 h. Cell pellets were obtained by centrifugation (1.900 x g at 4°C for 20 min) and frozen at –20°C overnight. Cell disruption was achieved by lysing the pellet in 8 M urea, 100 mM NaH₂PO₄ and 10 mM Tris (adjusted to pH 8 with NaOH as defined in Qiagen Ni-NTA Spin Handbook), followed by sonication for 30 min. Subsequent to centrifugation (1.900 x g, 4°C, 15 min) the supernatant was dialyzed against phosphate-buffered saline (PBS) at 4°C for 3 days (three changes of buffer).

Purification and Quantification of rNheC

Affinity purified anti-peptide antibodies (17 mg), derived from the IgG-fraction of a rabbit antiserum specific for NheC [15], were coupled to 1 g of CNBr-activated Sepharose 4B (GE Healthcare, Germany) according to the manufacturer's instructions. The resulting gel (3.5 ml) was used in a 5 ml column for the purification of rNheC under the following conditions: (i) storage buffer (PBS, containing 0.1% sodium azide) was replaced with PBS; (ii) 35 ml sample (*E. coli* supernatant dialyzed against PBS) were applied; (iii) column was washed with 20 ml PBS; (iv) bound rNheC was eluted with 16 ml glycine/HCl buffer (pH 2.5); immediately after elution pH was adjusted to 7.0 with 1 M Tris base; (v) column was washed with PBS and stored in storage buffer. The flow rate was constantly kept at 1 ml min⁻¹ throughout all steps. Eluted protein was dialyzed against PBS at 4°C for 3 days (three changes of buffer) and rNheC was stored at 4°C.

The purity of the toxin was checked by precasted SDS-PAGE minigels (Phast Gel gradient 10 to 15%) in a Phast System (GE Healthcare, Germany). Protein bands were visualized by SYPRO Ruby protein gel stain (Invitrogen, Germany) according to the manufacturer's protocol on a Kodak image station (Eastman Kodak, USA). Quantification was carried out by densitometry using bovine serum albumin (BSA) as a reference and TotalLab Nonlinear Dynamics Image Analysis Software (TotalLab, USA) for calculation.

Production of Monoclonal Antibodies (MAbs)

Immunization of mice, cell fusion experiments, establishment of hybridomas, and antibody purification were done as described by Dietrich et al. [18]. Purified rNheC was used as an immunogen for a group of five 12-week-old female hybrid mice [BALB/c × (NZW × NZB)]. Each mouse received 40 µg of rNheC, dissolved in 20 mM Tris base-HCl buffer (pH 7.4) and

emulsified in Freund's adjuvant. A first booster injection of another 40 µg of rNheC (in PBS) in incomplete Freund's adjuvant was applied at day 135. Three days before cell fusion, at day 176, a final booster injection of 60 µg rNheC dissolved in PBS followed.

Indirect EIA

To screen for antibody secreting hybridomas and to determine the relative antibody titers, an indirect EIA system was established [18] by using purified rNheC ($1\text{ }\mu\text{g ml}^{-1}$) as coating antigen and a horseradish-conjugated rabbit-anti-mouse antibody (Dako, Germany) at a dilution of 1:2,000 in 1% sodium-caseinate-PBS for detection. This indirect EIA system was also applied for further characterization of monoclonal antibodies reactive with NheC, with some modifications. Plates were coated with serial dilutions of purified rNheC and NheB, supernatants of *E. coli* expressing rNheA, as well as supernatants of *B. cereus* strains NVH 1230/88, NVH 0075/95 and MHI 1672. MAbs against NheC were added at a concentration of $1\text{ }\mu\text{g ml}^{-1}$ PBS and as a control NheC-specific rabbit antiserum [15] at a dilution of 1:1,000 in PBS, which was detected by a swine anti-rabbit antibody (Dako, Germany; diluted 1:2,000 in 1% sodium-caseinate-PBS).

Cytotoxicity and Neutralization Assay

Cytotoxic activity of purified rNheC in combination with *B. cereus* MHI 1672 supernatant was verified using Vero cells and water-soluble tetrazolium salt (WST-1; Roche Diagnostics, Germany) as described previously [14,18]. In order to analyze the neutralization capacity of the MAbs against NheC, this Vero cell assay was modified as described for neutralization of NheB-related cytotoxicity [17]. In a simultaneous assay, serial dilutions of *B. cereus* strain NVH 0075/95 alone or serial dilutions of purified rNheC together with a constant amount of MHI 1672 were incubated with 10 µg of the MAbs (1 mg ml^{-1} PBS). In a consecutive assay, serial dilutions of rNheC were placed into the microtiter plates together with 10 µg of the MAbs, followed by a constant amount of MHI 1672 in the second step. In both assays 10 µg of an unrelated MAb (MAb 5B2 against 3-acetyldeoxynivalenol, a *Fusarium* mycotoxin) served as a control.

Western Immunoblot Analyses

Samples were separated by SDS-PAGE, transferred to a PVDF-membrane (Immobilon-P; Millipore, USA) and blocked with 3% sodium-caseinate-PBS containing 0.025% Tween 20. The membrane was incubated for 1 h with the monoclonal antibodies (purified MAb $2 \mu\text{g ml}^{-1}$, MAb-supernatants 1:10 in 3% sodium-caseinate-PBS supplemented with 0.025% Tween 20) or with NheC antiserum at a dilution of 1:500 as a positive control. After three steps of washing in PBS containing 0.1% Tween 20, horseradish-conjugated swine anti-rabbit or horse anti-mouse antibodies (Cell Signaling Technology, USA) diluted 1:2,000 were applied for 1 h. The membrane was washed three times in PBS-Tween 20 (0.01%) and twice in PBS. Finally, Super Signal West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Pierce, USA) was applied and luminescence was recorded on a Kodak image station (Eastman Kodak, USA).

Epitope Mapping

Epitope mapping was done by PEPperPRINT GmbH (Heidelberg, Germany), as described by Stadler et al. [19]. In brief, the protein sequence of NheC (derived from *B. cereus* strain NVH 1230/88) was displayed as 13mer overlapping peptides with a shift of one amino acid. C- and N-termini were elongated by neutral GSGSGSGSG linkers. The peptides were spotted on a microarray (PEPperCHIP®, PEPperPRINT GmbH, Germany) and incubated with the four monoclonal antibodies ($1 \mu\text{g ml}^{-1}$) at 4°C overnight. Peptide microarrays were stained with fluorescence-labeled secondary antibodies and read by an Imaging System (Odyssey Imaging, USA).

Competitive Binding Analyses

Competitive binding of the antibodies was tested according to the method described by Friguet et al. [20] with some modifications. Microtiter plates were coated with NheC-specific rabbit antiserum, blocked and then rNheC was added at a concentration of 12.5 ng ml^{-1} for 1 h. After washing, saturating amounts (500 ng ml^{-1}) of the MAbs were added either separately or in combination of two different antibodies. Bound MAbs were detected by a rabbit anti-mouse antibody labeled with horseradish peroxidase (Dako, Germany; diluted 1:2,000 in 1% sodium-caseinate-PBS). Under these conditions, non-competitive binding of an

antibody pair results in an additive increase of the assay response and the relative additivity index was calculated for each antibody pair [20].

Immunofluorescence Microscopy

Vero cells (Bio Whittaker, Belgium) were seeded in 8-well Lab-Tek chamber slides (Nunc, Germany) at a density of 60,000 per well and cultivated at 37°C in an atmosphere of 7% CO₂ overnight. Cells were incubated with purified rNheC (400 ng ml⁻¹ or 1.6 µg ml⁻¹, corresponding to 125 and 500 ng per well) or fresh cell-culture medium as negative control for 2 h, washed carefully and subsequently fixed in ice-cold methanol for 10 min. After blocking with 5% inactivated goat serum (MP Biomedicals, Germany) for 1 h, MAbs against NheC were added. MAbs were detected by Alexa Fluor 488-conjugated anti-mouse secondary antibody (Invitrogen, Germany) at a concentration of 15 µg ml⁻¹. Goat serum and the MAbs against NheC were diluted in PBS containing 1% bovine serum albumin (BSA). Nuclei were counterstained with DAPI (Prolong Gold antifade reagent with DAPI; Nunc, Germany) and the slides were screened with a BZ-8000 fluorescence microscope (Keyence, Germany). Cells were analyzed by z-series, using full focus and haze reduction. Confocal pictures were taken with a Hitachi HV-C20A (Hitachi, Japan) digital camera connected to a Zeiss LSM 510 microscope (Carl Zeiss GmbH, Germany).

Flow Cytometry

Vero cells were grown to confluency, trypsinated and adjusted to 1,000,000 cells per ml in EC-buffer (140 mM NaCl, 15 mM HEPES, 1 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂, 10 mM glucose pH 7.2). Experimental set-up was as follows: i) Vero cells without treatment; ii) Vero cells incubated with MHI 1761 (natural ratio of NheB:NheC 10:1); iii) Vero cells incubated with MHI 1761 supplemented with rNheC (ratios of NheB:NheC 1:1, 2.5:1, 5:1). Cell treatment was carried out at 37°C for 30 min. After washing the cells twice in 1% BSA-PBS primary antibodies were added at 2 µg ml⁻¹ (MAb 1E11 for detection of NheB and unspecific MAb 5B2 for isotype control). MAbs were allowed to bind for 30 min, followed by washing twice and incubation with secondary Alexa Fluor 488-conjugated anti-mouse secondary antibody (Invitrogen, Germany). After two final rounds of washing, cells were analyzed using a FACSCalibur (BD Bioscience, USA) and CellQuestPro software (BD Bioscience, USA). Prior to analysis propidium iodide (2.5 µg ml⁻¹) was added to the cell suspension.

Sandwich Enzyme Immunoassay for Detection of NheC

Sandwich enzyme immunoassays (sandwich EIAs) were established in order to enable the sensitive detection of NheC in solution. After optimization of techniques as described previously [21], the following protocol was established: microtiter plates were coated with NheC-specific rabbit antiserum at a dilution of 1:1,000 in bicarbonate buffer (0.05 mol l⁻¹, pH 9.6) over night at room temperature. After blocking of free protein binding sites with 3% sodium-caseinate-PBS for 30 min and a washing step, serial dilutions (in PBS containing 0.05% Tween 20) of purified rNheC or *B. cereus* supernatants were added for 1 h. The next washing step was followed by addition of the MAbs reactive with rNheC diluted in 1% sodium-caseinate-PBS (MAbs 1E12 and 2F10: 2.5 µg ml⁻¹, MAbs 2G8 and 3D6: 1.25 µg ml⁻¹) and another incubation for 1 h. Bound MAbs were detected by a rabbit anti-mouse antibody labeled with horseradish peroxidase (Dako, Germany; diluted 1:2,000 in 1% sodium-caseinate-PBS).

Sandwich EIA for Detection of NheB-NheC Complexes

A sandwich EIA was used to detect NheB-NheC complexes by combining MAb 3D6 and MAb 1E11, specific for NheC and NheB, respectively. Microtiter plates were coated with MAb 3D6 (3 µg ml⁻¹) diluted in PBS. Culture supernatants of *B. cereus* strains were added in serial dilutions. After a washing step, horseradish peroxidase-labeled MAb 1E11 was added at a dilution of 1:1,500 in 1% sodium-caseinate-PBS.

Dot Blot Analyses

Purified rNheC (100 µl per dot) was applied to a PVDF-membrane (Immobilon-P; Millipore, USA) either as a dilution series ranging from 100 to 6 ng ml⁻¹ or adjusted to a constant concentration of 25 ng ml⁻¹. After removal from the dotting chamber, membranes were blocked with 3% sodium-caseinate-PBS overnight. NheB (from supernatant of MHI 1672) was diluted in PBS to concentrations between 250 and 2.5 ng ml⁻¹, and overlaid on the dots for 1 h. After washing, membranes were incubated with NheB-specific MAb 1E11 (1 µg ml⁻¹ in 3% sodium-caseinate-PBS containing 0.025% Tween 20) for 1 h and horseradish-peroxidase-labeled rabbit anti-mouse secondary antibody (Dako, Germany; diluted 1:2,000 in 1% sodium-caseinate-PBS) for 1 h. After incubation with Super Signal West Femto

Maximum Sensitivity Substrate (Pierce, USA) signals were recorded on a Kodak image station (Eastman Kodak, USA).

Crosslinking of NheB and rNheC

Purified NheB and rNheC were incubated at molar ratios of 1:1, 1:2 and 1:10 for 30 min at 4°C. Crosslinking was achieved by addition of a 1000-fold molar excess of DSP (Dithiobis[succinimidylpropionate]; Thermo Scientific, Germany) for 5 min at room temperature. Crosslinking was stopped by the means of 0.1 M Tris base. Samples were subsequently prepared for and submitted to Western immunoblot analysis. NheC-specific MAb 3D6 served as detection antibody (3 $\mu\text{g ml}^{-1}$ in 3% sodium-caseinate-PBS containing 0,025% Tween 20).

RESULTS

Monoclonal Antibodies against NheC

Production. Since earlier attempts to produce NheC-specific MAbs by using crude toxin preparation failed, highly purified recombinant NheC was used for the immunization of mice. Immunoaffinity chromatography-purified fractions of rNheC contained 10 to 20 $\mu\text{g ml}^{-1}$ of rNheC as determined by SYPRO Ruby protein staining of SDS-gels and showed no visible impurities (Fig. S1). NheC-specific rabbit antiserum [15] showed reactivity against purified rNheC, both in indirect EIA and in Western immunoblotting, revealing a band of approximately 37 kDa (Fig. 1A). Furthermore, after combining purified rNheC (1 ng ml^{-1}) with cell free supernatant of *B. cereus* strain MHI 1672 (producing NheA and NheB) cytotoxic effects on Vero cells were induced. Purified rNheC was used for immunization and two booster injections of mice. A total of 19 hybridoma cell lines secreting antibodies reacting with rNheC were identified. For further characterization, three hybridomas producing IgG antibodies and one producing an IgM antibody were chosen (Table 1).

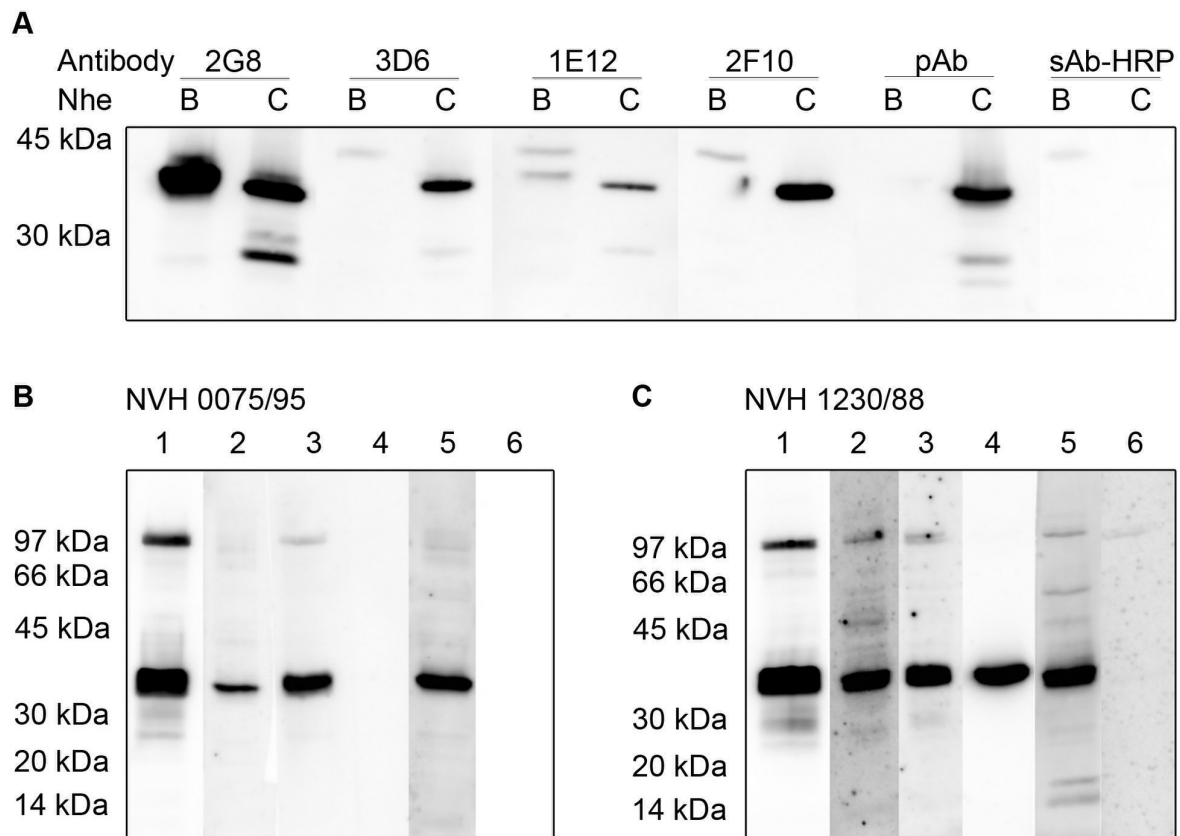


Figure 1. Western immunoblots showing reactivity of the monoclonal antibodies with purified Nhe-components and exoprotein preparations of *B. cereus* strains.

(A) Reactivity with NheB and purified rNheC; rabbit antiserum (rAs; polyclonal antibody, pAb) against NheC served as a positive control. Reactivity between 20 and 30 kDa represented protein degradation. Negative control, peroxidase-labeled secondary antibody (sAb-HRP) only, showed a minor band at approximately 43 kDa in each NheB lane due to unspecific reaction of secondary antibody. Reactivity of the antibodies with exoprotein preparations from *B. cereus* strain NVH 0075/95 (B) and *B. cereus* strain NVH 1230/88 (C), each concentrated 20-fold: MAb 2G8 (lane 1), MAb 3D6 (lane 2), MAb 1E12 (lane 3), MAb 2F10 (lane 4), rAs (lane 5) and the negative control (lane 6) as described in (A).

doi:10.1371/journal.pone.0063104.g001

Table 1. Characteristics of the monoclonal antibodies.

Monoclonal antibody	Subtype	Specificity	Sensitivity (ng ml ⁻¹) ^a		Additivity index (%) ^b			
			rNheC	NheB	2G8	3D6	1E12	2F10
2G8	IgG ₁	NheB, C	10	49	–	81	38	83
3D6	IgM ^c	NheC	25	n.d. ^d	–	–	90	80
1E12	IgG _{2a}	NheB, C	16	66	–	–	–	98
2F10	IgG ₁	NheC	65	n.d.	–	–	–	–

^aValues given represent the concentration of the coating antigen, which resulted in an absorbance of 0.5 units under the conditions of the indirect EIA.

^bA low additivity index (<50%) indicates competition of the respective MAbs for the same binding site. A high value indicates simultaneous binding to different epitopes [20].

^cMonomer.

^dNot detectable.

doi:10.1371/journal.pone.0063104.t001

Properties. Western immunoblot and indirect EIA were performed to characterize the specificity of the four monoclonal antibodies (Table 2, Fig. 1). All four monoclonals showed immunoreactivity in EIA and revealed a distinct band at 37 kDa against rNheC (derived from NVH 1230/88) in Western immunoblotting (Table 2 and Fig. 1A). A band of same size was observed when applying crude culture supernatant of *B. cereus* strain NVH 1230/88 (Table 2 and Fig. 1C). Crude culture supernatant of *B. cereus* strain NVH 0075/95 yielded similar bands at 37 kDa for three of the MAbs, whereas MAb 2F10 showed no reactivity (Table 2 and Fig. 1B). In order to check potential cross-reactivity of the monoclonal antibodies with other Nhe-components, rNheA, purified NheB and a supernatant of *B. cereus* strain MHI 1672 (producing both NheA and NheB) were tested in the indirect EIA and the Western immunoblot assay. None of the four monoclonal antibodies bound to rNheA (Table 2). Two antibodies (MAb 2G8 and MAb 1E12), however, revealed a distinct reactivity with NheB (Table 2 and Fig. 1A). To further characterize the binding of the antibodies to NheC and NheB, indirect EIAs were carried out, using plates coated with serial dilutions of purified rNheC and NheB, respectively. The concentration of the coating antigen giving the same assay response ($OD = 0.5$) was used as a relative measure of the antibodies' binding strength allowing comparison of assay sensitivity (Table 1). All antibodies were able to detect rNheC in the low nanogram-range and reactivity of MAb 2G8 and MAb 1E12 with NheB was 4–5 fold lower compared to rNheC.

Neutralization capacity of the monoclonal antibodies was tested on Vero cells under different experimental conditions as described earlier [17]. Neither in the simultaneous nor the consecutive assay setup neutralization of Nhe-related cytotoxic activity was observed.

Table 2. Reactivity of Nhe-components and *B. cereus* strains with the monoclonal antibodies.

Component/Strain	Monoclonal antibody ^a			
	2G8	3D6	1E12	2F10
rNheC ^b	+	+	+	+
NheB ^c	+	–	+	–
RNheA	–	–	–	–
NVH 1230/88	+	+	+	+
MHI 1672	+	–	+	–
NVH 0075/95	+	+	+	–

^aPositive (+) and negative (–) results in the indirect EIA.

^bPurified recombinant NheC, originating from *B. cereus* strain NVH 1230/88.

^cPurified NheB, from *B. cereus* strain MHI 1672 (producing NheA and NheB).

doi:10.1371/journal.pone.0063104.t002

Epitopes. MAb 2F10 showed a unique reactivity pattern both in EIA and in Western immunoblot analyses. Epitope-mapping revealed a well-defined epitope close to the N-terminus of rNheC (Fig. 2). Clustal alignment of published *nheC* sequences indicated that this region of *nheC* frequently shows heterology resulting in amino acid exchanges. Thus the distinct reactivity pattern of MAb 2F10 (Fig. 1), i.e. clear reactivity with rNheC and *B. cereus* strain NVH 1230/88 (used for generation of rNheC), but no reactivity with *B. cereus* strain NVH 0075/95, reflects just this local sequence dissimilarity between both strains. Comparison of the amino acid sequences of NVH 1230/88 and NVH 0075/95 (Fig. S2) reveals an exchange of amino acids at position 37 and 38 as well as at positions 42 to 43. Thus the epitope of MAb 2F10 (KVLQENVK) is replaced by the sequence KIQQENAN in strain NVH 0075/95. This difference is enough to fully prevent antibody binding, meaning that assays using MAb 2F10 will selectively detect *B. cereus* strains matching the NVH 1230/88 sequence of the antibody binding site.

MAb 2G8 showed not only a distinct band towards recombinant NheC at 37 kDa, but also an additional band at 39 kDa indicating cross-reactivity with NheB (Table 2, Fig. 1). The strong reactivity with the top band at approximately 100 kDa is common for antibodies reacting with NheB [15], and the band was identified to represent an oligomer of NheB by

two-dimensional gel electrophoresis and N-terminal sequencing [22]. Cross-reactivity of some of the antibodies with NheB was expected, because substantial sequence homologies exist between the B- and C-component of the Nhe-complex [9]. The epitope of MAb 2G8 (Fig. 2), as detected by peptide microarray, covers amino acids NIINYNNTFQ, a sequence that is sufficiently (NIINYN) conserved in NheB at position 131 to 136 to allow antibody binding (Fig. S2). According to the structural model of NheC (Fig. 2E), this epitope is located within a predicted α -helix. Considering the consistent reactivity pattern of MAb 2G8 found in both EIA (Table 1 and Table 2) and Western immunoblot analyses (Fig. 1A), a continuous binding site can be assumed.

According to the results of the peptide microarray, the most likely epitope of MAb 3D6 was in the range of amino acids 287 to 296 (TNMTETIDAA). MAb 3D6 was an IgM-monomer, highly specific for NheC, and its binding site was within a predicted α -helix close to the C-terminal end (Fig. 2). Reactivity with NheC in EIA and Western immunoblot was consistent (Table 2, Fig. 1), indicating a continuous epitope, which seemed to be conserved in all *B. cereus* strains tested.

MAb 1E12 showed a more polyclonal reactivity pattern and a putative epitope was located within amino acids 116 to 140 (QIMKTDQNIINYNNTFQSYNDMLI), which includes the sequence NIINYNNTFQ recognized by MAb 2G8. In the Western immunoblot MAb 1E12 also showed an additional band at 39 kDa indicating cross-reactivity with NheB (Table 2, Fig. 1). These results indicated a main binding region similar to that of MAb 2G8, which was in accordance with the low additivity index obtained for this antibody pair (Table 1). Competitive binding due to overlapping or sterically close epitopes was, however, not found for any of the other possible combinations of antibodies (Table 1). Furthermore, MAb 1E12 showed a much lower reactivity in the Western immunoblot than MAb 2G8 (Fig. 1A), but only slightly less sensitivity in EIA analyses (Table 1). Also the cross-reactivity pattern with NheB was not consistent in both methods. Most likely, this could be due to binding to a discontinuous epitope, in which the binding site is completed by amino acids adjacent in the tertiary structure, but not after SDS-PAGE.

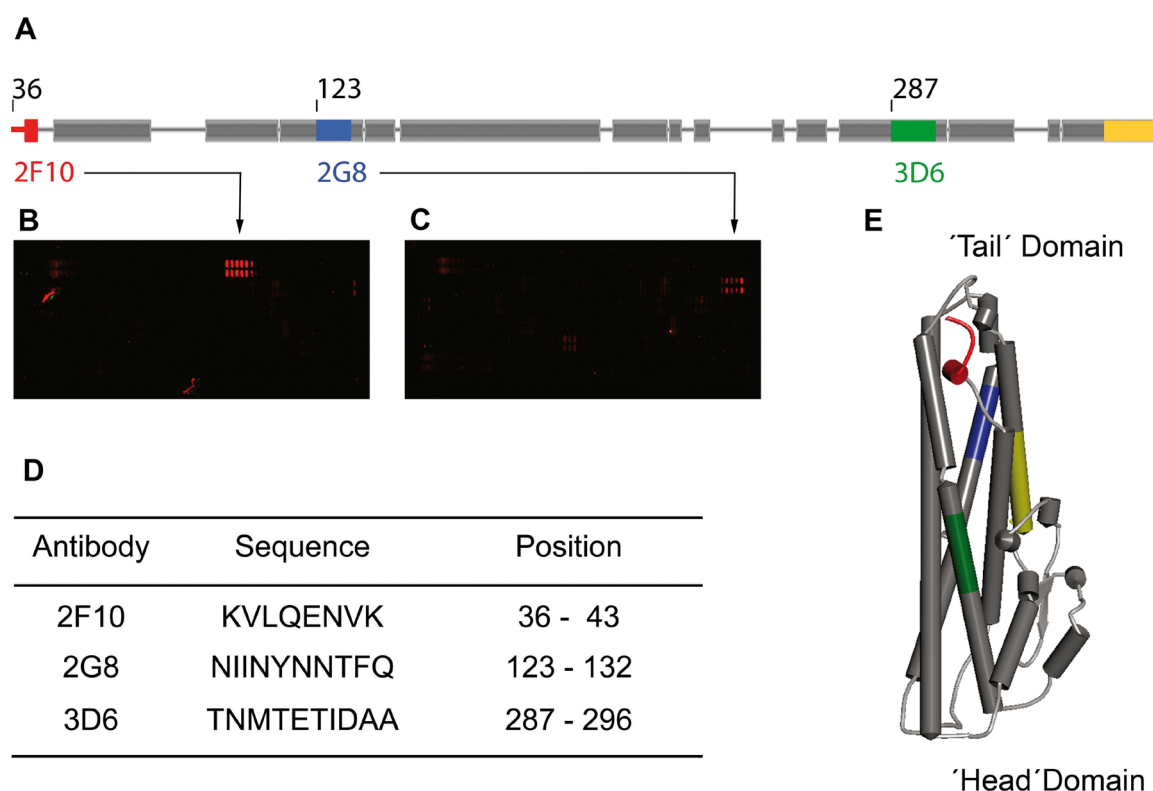


Figure 2. Epitopes of MAb 2G8, 3D6 and 2F10 within the sequence of NheC (derived from *B. cereus* strain NVH 1230/88, GenBank accession code: CAB53340.2).

(A) Localisation of the epitopes within the secondary structure model: MAb 2F10 (red), MAb 2G8 (blue) and MAb 3D6 (green); the yellow area depicts the peptide used for production of the rabbit antiserum; amino acids 1 to 35 are not shown. (B) and (C) Epitope mapping on a peptide microarray, exemplified illustrations for MAb 2F10 (B) and MAb 2G8 (C); red double spots indicate the peptide consensus motif, irregular spots are impurities. (D) Sequences and positions of the mapped epitopes. (E) Homology model of NheC obtained by SWISS-MODEL [33-35], using the Hbl-B crystal structure (PDB ID:2nrj) [12] as a template, showing the MAb epitopes colored according to (A) (drawn by Accelrys Discovery Studio 3.0 Visualizer).

doi:10.1371/journal.pone.0063104.g002

Immunocytochemistry. Immunofluorescence pictures showed that each of the monoclonal antibodies was able to bind to cell-bound rNheC (Fig. 3). Particularly MAb 3D6 and a low concentration of rNheC ($0.4 \mu\text{g ml}^{-1}$) gave a homogeneously distributed staining using conventional fluorescence microscopy (Fig. 3B) as well as confocal laser scanning imaging (Fig. 3C). At higher concentrations ($1.6 \mu\text{g ml}^{-1}$ rNheC), the antibodies tended to produce a more punctuated fluorescence pattern (Fig. 3D–F), probably due to formation of multimeres of rNheC. Overall, these results indicated that the epitopes of the monoclonal antibodies were not involved in cell binding of NheC.

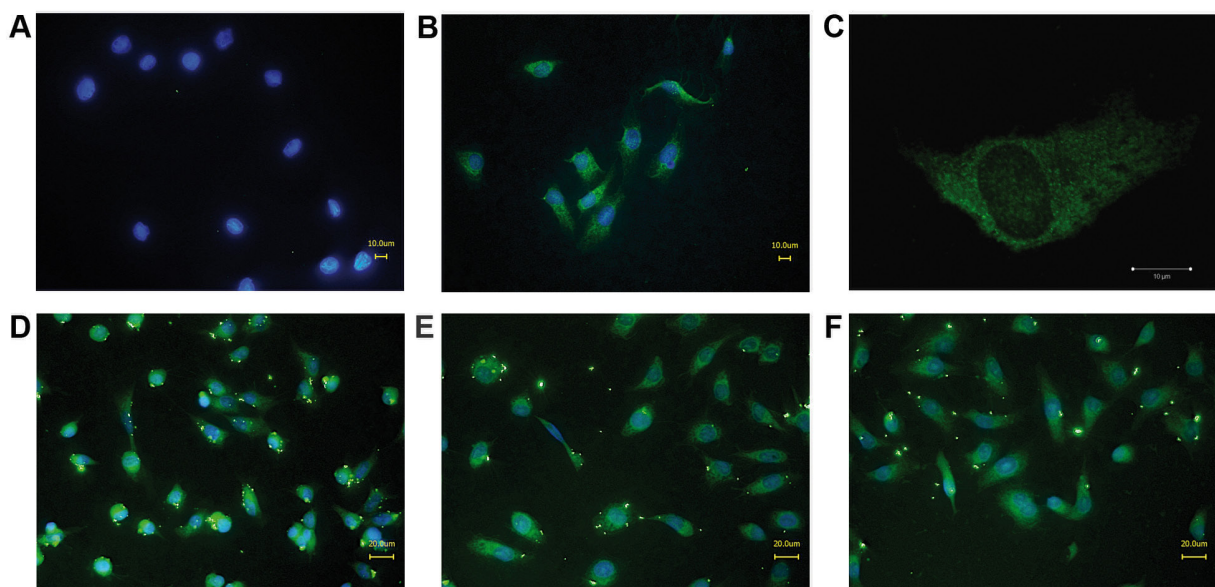


Figure 3. Monoclonal antibodies react with cell-bound rNheC.

Vero cells, untreated (A) and treated with 400 ng ml^{-1} rNheC were stained with MAb 3D6 (B). A single cell image obtained by confocal laser scanning microscopy is shown in (C). Vero cells treated with $1.6 \mu\text{g ml}^{-1}$ rNheC and stained with MAb 2G8 (D), MAb 1E12 (E) as well as MAb 2F10 (F). All MAbs were detected by Alexa Fluor 488-labeled secondary anti-mouse antibody.

doi:10.1371/journal.pone.0063104.g003

Complex Formation between NheB and NheC

Only trace amounts of NheC are detectable in culture supernatants of *B. cereus*. To examine the presence of NheC in *B. cereus* culture supernatants, sandwich EIAs were established and validated by using rNheC. Using the previously described polyclonal rabbit antiserum against NheC [15] for capture and the newly developed MAbs for detection, as low as 2–10 ng ml⁻¹ of NheC could be detected (Fig. 4). The most intense signal was obtained by using MAb 3D6, the linear range of the dose-response curve was between 20 and 200 ng rNheC per ml. Using this sensitive assay, the NheC productivity of *B. cereus* strains was analyzed. However, only trace amounts of NheC were found in the respective culture supernatants, detectable concentrations ranged from < 0.01 to 0.03 µg ml⁻¹ (Table 3). Considering that the NheB concentrations found in the supernatants were mostly above 1 µg ml⁻¹, and since a ratio between NheB and NheC of approximately 10:1 is necessary for maximum toxicity [10,14], the corresponding NheC levels were expected to be above 0.1 µg ml⁻¹. Therefore, for most strains the NheC concentration measured, represented less than 1% of the expected values.

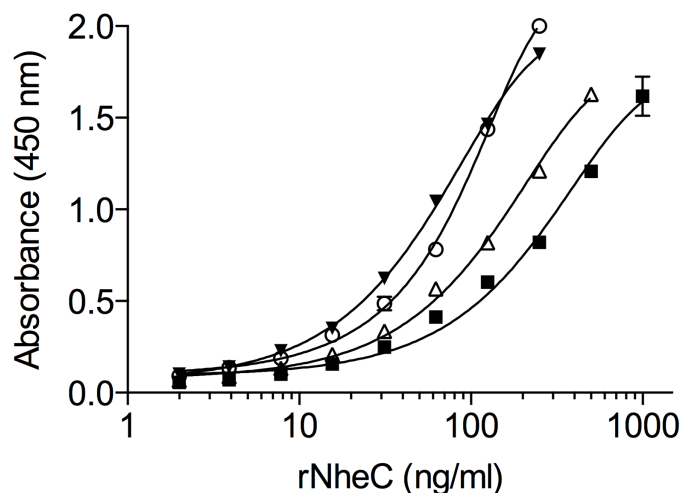


Figure 4. Sandwich EIA for the detection of NheC.

Rabbit antiserum raised against NheC was used for coating the microtiter plates (capture antibodies) and the monoclonal antibodies for detection (MAb 3D6, closed triangle; MAb 2G8, open circle; MAb 1E12, open triangle; MAb 2F10, closed square). Three independent experiments were performed for each combination and a representative curve is shown.

doi:10.1371/journal.pone.0063104.g004

Table 3. Concentrations of NheB and NheC compared to the titer of NheB-C complexes in supernatants of *B. cereus* strains.

Strain	NheB ($\mu\text{g ml}^{-1}$) ^a	NheC ($\mu\text{g ml}^{-1}$) ^b	NheB-C complex ^c
Reference strains			
NVH 0075/95	11.50	<0.01	++
NVH 1230/88	5.81	0.08	++
NVH 0391/98	<0.01	<0.01	–
Food related strains			
MHI 1477	4.64	<0.01	++
MHI 1493	13.97	<0.01	++
MHI 1496	5.43	<0.01	++
MHI 1503	12.41	<0.01	++
MHI 1507	5.03	<0.01	+
MHI 1522	4.34	0.02	++
MHI 1527	4.19	0.01	++
MHI 1541	2.22	0.03	++
MHI 1543	4.44	0.01	++
MHI 1556	<0.01	<0.01	–
MHI 1668	1.27	0.01	+
MHI 1670	1.15	0.03	++
MHI 1676	<0.01	<0.01	–
MHI 1692	4.16	0.01	++
MHI 2963	5.14	0.01	++
MHI 2964	5.54	<0.01	++
MHI 2965	5.49	<0.01	++
MHI 2967	4.50	<0.01	+
MHI 2968	4.90	<0.01	++
MHI 2970	0.10	<0.01	++
MHI 2971	6.31	<0.01	+
MHI 2972	9.76	<0.01	++

^aSandwich EIA according to [21].^bSandwich EIA described in this study.^cSandwich EIA described in this study, results expressed as reciprocal values of the titers, classified as follows: –, titers of <3; +, titers of 3 to 99; ++, titers ≥ 100 .

doi:10.1371/journal.pone.0063104.t003

NheC forms a complex with NheB in natural culture supernatants of *B. cereus*. To test the hypothesis that NheC is bound to NheB in culture supernatants, a sandwich EIA was designed enabling the specific detection of these complexes. Here, the NheC-specific MAb 3D6 served as capture antibody and detection of bound complexes was enabled by the use of the previously described NheB-specific MAb 1E11 [15]. The assay was optimized using the Nhe positive reference strains NVH 1230/88 and NVH 0075/95. *B. cytotoxicus* NVH 0391/98, producing highly divergent Nhe proteins [23], which did not react with the MAbs against NheB and NheC, served as a negative control. Analyzing serial dilutions of cell-free culture supernatants of these strains proved the applicability of the sandwich EIA and revealed that NheC forms stable complexes with NheB under these growth conditions (Fig. 5). The reference strains NVH 0075/95 and NVH 1230/88 showed a clear positive reaction while NVH 0391/98 was negative. Expanding the analyses to 22 other *B. cereus* strains underlined these results. NheB negative strains MHI 1556 and MHI 1676 showed no reactivity in the complex-specific EIA, whereas in the supernatants of all other strains (producing NheB and NheC) immunoreactive complexes were detected (Table 3).

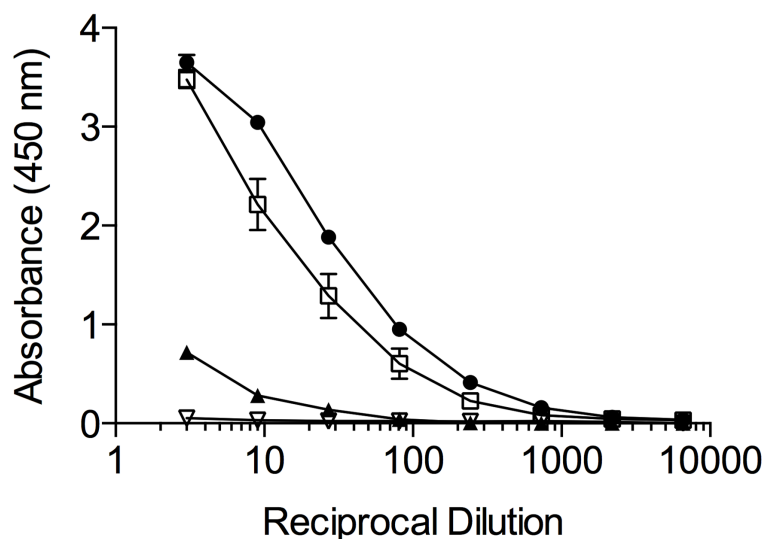


Figure 5. Sandwich EIA for detection of NheB-NheC complexes.

Dilution curves obtained for the reference strains NVH 0075/95 (open squares) and NVH 1230/88 (closed circles) in the sandwich EIA (capture antibody MAb 3D6 against NheC; detection antibody MAb 1E11-HRP against NheB). Purified NheB (closed triangles) and rNheC (open triangles) served as negative controls. Three independent experiments were performed for each strain and a representative curve is shown.

doi:10.1371/journal.pone.0063104.g005

Concentration of the complex between NheB and NheC is inversely correlated with toxicity. To address the question whether these complexes are important for cytotoxic action of Nhe, we compared the level of complex formation with cytotoxicity on Vero cells (Fig. 6). A diluted supernatant of strain MHI 1672, containing approximately 40 ng ml⁻¹ each of NheA and NheB, was supplemented with rNheC. At a 1:1 ratio between NheB and NheC, toxicity was reduced to background level. The cytotoxicity reached a maximum plateau at ratios between 5:1 and 50:1. A further decrease of the NheC concentration to or below a 100:1 ratio abolished cytotoxicity (Fig. 6A). The level of complex formation between NheB and NheC was directly correlated with the relative concentrations of NheB and NheC (Fig. 6B). To further prove the result obtained in the immunoassay, purified NheB and rNheC were mixed at different ratios, cross-linked with DSP and the resulting products were analyzed by SDS-PAGE and Western immunoblotting using MAb 3D6 (Fig. 6C). Without NheB and at excess concentrations of rNheC the monomeric form of NheC was detectable, while it gradually disappeared with increasing concentrations of NheB. At a 1:1 ratio between NheB and NheC the NheC monomer was no longer detectable and the band corresponding to the covalently linked complex became most intense. In addition, dot blots using MAb 1E11 against NheB clearly showed binding of NheB to membranes coated with rNheC (Fig. 6D). The binding of NheB was dependent on the concentration of rNheC on the dots, and maximum binding was achieved at a 1:1 ratio between NheB and NheC or at excess concentrations of NheB.

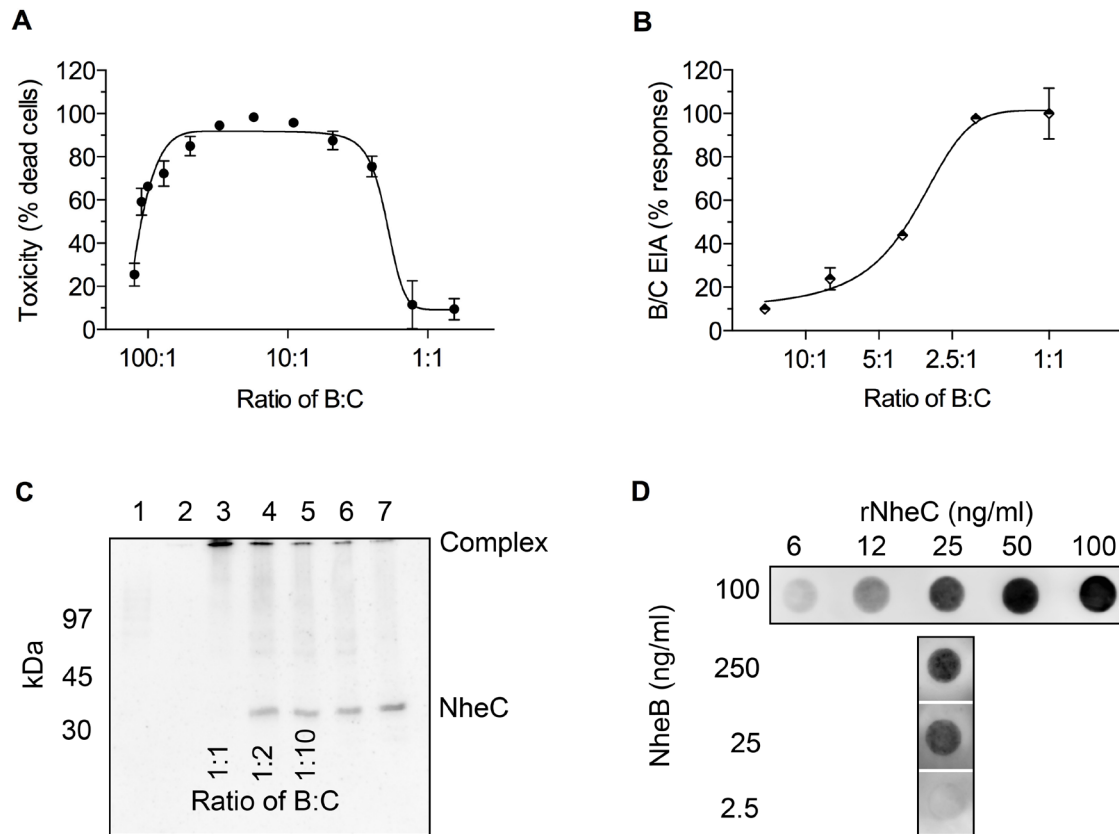


Figure 6. Comparison of toxicity and complex formation.

(A) The bell-shaped dose-response curve obtained in the WST-assay showed maximum cytotoxicity between a 50:1 and 5:1 ratio of NheB and NheC. (B) Increase of complex formation between NheB and NheC as detected by sandwich EIA, reaching maximum assay response above a 2.5:1 ratio. (C) Crosslinking analysis of the oligomerization of NheB and NheC. Purified NheB and rNheC were mixed at molar ratios of 1:1 (lane 3), 1:2 (lane 4) and 1:10 (lane 5), crosslinked and detected by NheC-specific MAb 3D6. Purified NheB (lane 1) and rNheC (lane 7) as well as NheB mixed with DSP (lane 2) and rNheC mixed with DSP (lane 6) served as controls. (D) Dot blot analysis of complex formation between NheB and NheC. The concentration of rNheC used for membrane coating is indicated on the horizontal axis, the concentration of NheB applied in the second step is shown on the vertical axis. Three to four independent experiments were performed for each combination and a representative blot is shown.

doi:10.1371/journal.pone.0063104.g006

Complex Formation between NheB and NheC Enhances and Inhibits Cell Binding of NheB

In order to quantify the percentage of cell-bound NheB-C complexes, Vero cells were examined by flow cytometry (Fig. 7A, B). Cells were incubated with culture supernatant from MHI 1761 (producing NheB and NheC at a 10:1 ratio) with and without supplementation of rNheC. The supernatant was additionally analyzed by sandwich EIA for quantification of NheB as well as by the complex-specific sandwich EIA. Accordingly supernatants of the strains were diluted to a final concentration of app. 40 ng ml⁻¹ NheB. Further experimental set-ups included i) no supplementation of rNheC, ii) supplementation of rNheC to achieve ratios between NheB and NheC of 1:1, 2.5:1 and 5:1. As the tripartite Nhe toxin is known to induce pore-formation on the target cells, all samples were assayed in the presence of propidium iodide (PI). Although the different treatments did not affect cell morphology and granulation as determined by forward scatter and side scatter signals, incubation with diluted MHI 1761 resulted in 5–10% cells positive for PI fluorescence. Effects caused by the supplementation of additional rNheC were analyzed in the PI negative cells only. The diluted MHI 1761 culture supernatant with a natural ratio between NheB and NheC (10:1) resulted in 63% ± 5.22 cells positive for NheB binding. Adjusting NheB:NheC ratios to 5:1 and 2.5:1 by addition of rNheC, reduced the NheB signal to 26% ± 2.44 and 13% ± 3.04, respectively. Finally, a ratio between NheB and NheC of 1:1 gave a positive signal in only 4% ± 1.24 of the cells.

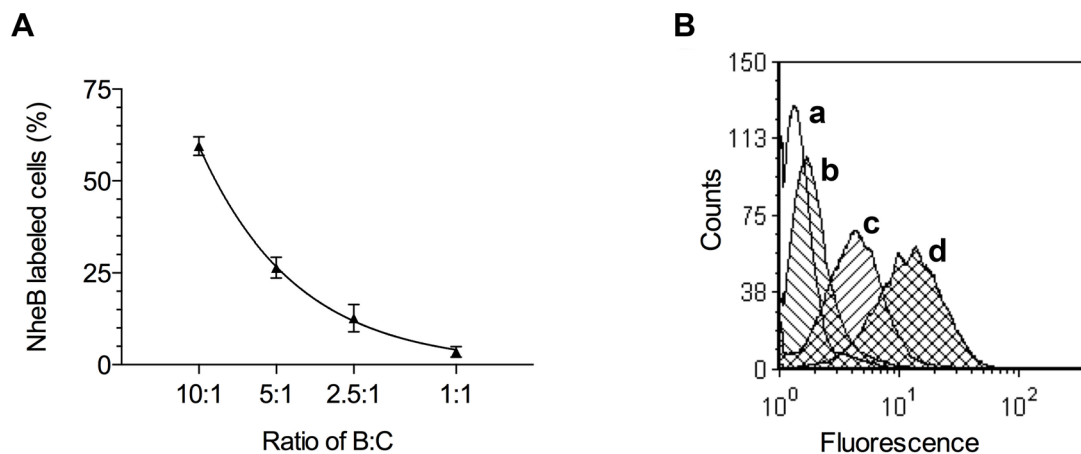


Figure 7. Binding of NheB to Vero cells.

(A) Decrease of NheB binding to Vero cells as determined by flow cytometry. (B) Histogram showing the overlay of NheB-specific fluorescence counts (FL1-H) for the isotype control (a), a 1:1 (b), 5:1 (c), and 10:1 (d) ratio between NheB and NheC.
doi:10.1371/journal.pone.0063104.g007

DISCUSSION

Besides Hbl, Nhe represents a second tripartite enterotoxin involved in the etiology of *B. cereus* food poisoning [7]. The *nhe* genes could be found in most *B. cereus* isolates [24–27], and Nhe seems to be the most prevalent enterotoxin produced by *B. cereus*. Recent studies on the mode of action of Nhe [14,17] indicated that NheC is able to bind to NheB in solution and that both components can bind to cell membranes. Additionally, it was shown that the Nhe components require a specific binding order and NheC was mandatory in the priming step to achieve maximum cytotoxicity. Further in depth studies on the role of the interaction between NheB and NheC in Nhe-induced cytotoxicity were, however, hampered by the lack of powerful analytical tools such as monoclonal antibodies against the C-component.

For this purpose we established four cell lines secreting antibodies reactive towards rNheC. Two of the MAbs (2G8 and 1E12) showed cross-reactivity with NheB, but MAbs 2F10 and 3D6 were highly specific for NheC and particularly suited for the intended studies. Recently we showed that inhibition of ordered binding of the individual Nhe components, particularly by preventing binding of NheA to NheB on the cell surface by MAb 1E11 against NheB, was

an efficient way to neutralize Nhe toxicity [17]. However, none of the MAbs against NheC developed in this study, reduced Nhe toxicity, not even when NheC was pre-incubated with MAbs prior to addition of the other components. This result indicates that the epitopes of the MAbs against NheC are not involved in the interaction between the individual Nhe components and probably do not interfere with cell binding of NheC. The latter assumption was proved by fluorescence microscopic images, which clearly demonstrated a NheC-dependent staining of Vero cells in presence of the MAbs (Fig. 3). These results are in agreement with the structural model of NheC (Fig. 2E), from which it could be predicted that the epitopes of the antibodies are not located in the head region and show sufficient distance to the putative trans-membrane region containing the beta-hairpin [14] in order to not inhibit binding of NheC to the cell surface.

According to the current model, the first step in the mode of action of Nhe is binding of NheB and NheC to the cell surface, but interaction between both components occurs most likely before cell binding. Since the hetero-oligomers of NheB and NheC formed in solution are not stable under SDS-PAGE conditions (Fig. S3), evidence for complex formation has been provided by immunoblotting experiments on native gels [10], as well as by co-immunoprecipitation of NheB and NheC [14]. Here we further confirm the formation of hetero-oligomers between NheB and NheC by crosslinking analyses and dot blotting. However, a major drawback of all these methods is that they only can demonstrate complex formation in artificial systems requiring purified Nhe components. Therefore, we wanted to establish a simple method for the detection of complexes between NheB and NheC, applicable to natural culture supernatants. For this purpose, we tested the suitability of the antibodies to detect complexes between NheB and NheC in a sandwich immunoassay. In combination with the previously developed rabbit antiserum against NheC, all four MAbs were able to detect rNheC in a sandwich immunoassay (Fig. 4) with a detection limit below 10 ng ml^{-1} . When however, culture supernatants were analyzed for NheC, no or only minor amounts were detected (Table 3, data shown for MAb 3D6). The lack of detectable NheC indicated that either the concentration of NheC was lower than expected or that at least one binding site of the antibodies was not accessible in the culture supernatants due to complex formation between NheC and NheB. To test the latter hypothesis, we constructed a sandwich immunoassay using the NheC-specific monoclonal antibody 3D6 for capture and MAb 1E11 [15] against NheB (labeled with HRP) for detection. As expected, this assay gave a positive result for the tested supernatants, indicating the presence of NheB-NheC complexes. Considering the low amount of NheC detected in the NheC-specific assay, it could be

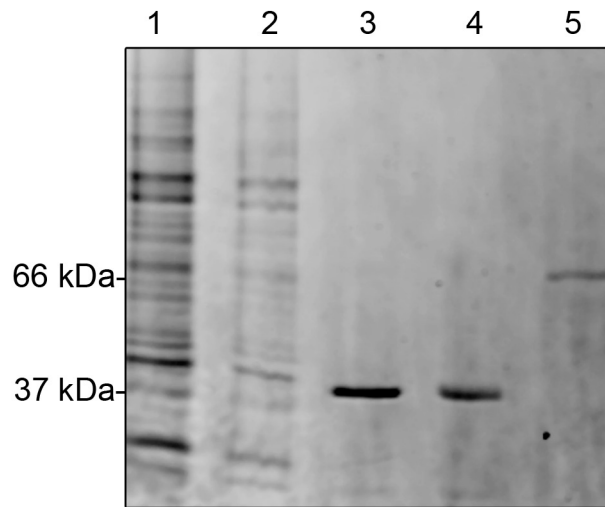
concluded that in culture supernatants more than 90% of NheC is bound to NheB. On the other hand, there was no correlation between the concentration of NheB and the titer observed in the NheC/B assay in culture supernatants (Table 3). Though all three Nhe components are transcribed from one operon after activation by the global transcriptional activator PlcR [28], it is not fully understood which mechanisms lead to the different secretion levels of NheB and NheC. A recent study, showing that the premature Nhe proteins contain Sec-type signal peptides and are secreted via the Sec pathway, did not indicate accumulation of individual premature components in the cell [29]. On the other hand, a stem-loop structure between *nheB* and *nheC* was predicted from the *nhe* sequence [9] and it has been suggested that the relative low level of expression of NheC is caused by translational repression due to secondary structure formation at or close to the ribosome binding site [10]. As the intergenic sequences between *nheB* and *nheC* are variable (unpublished data), it could be assumed that the extent of this repression differs from strain to strain, leading to variable concentration ratios between NheC and NheB, finally resulting in different levels of complex formation.

To address the question about the function of the complexes between NheB and NheC, we compared complex formation to cytotoxicity on Vero cells (Fig. 6A, B). Cell binding of NheB was quantified by flow cytometry (Fig. 7A, B). The relative amount of complexes was directly correlated with the ratio between NheB and NheC. Toxicity, however, showed a bell-shaped dose-response curve with a maximum level between NheB:NheC ratios of 50:1 and 5:1. Most interestingly, flow cytometry showed that the highest percentage of NheB binding to Vero cells was found when the ratio between NheB and NheC was in the above-mentioned range. Significantly less NheB positive cells were seen when the ratio between NheB and NheC was lower than 5:1, accompanied by high levels of complex formation. It has been speculated that the mechanism behind the inhibitory effect of excess NheC is the formation of NheB-NheC complexes, which are substantially impaired in cell binding [14]. The results shown in this study indicate a more complex situation. A defined level of NheB-NheC complexes as well as a sufficient amount of free NheB seem to be necessary for efficient cell binding and toxicity of Nhe. Interestingly, we have shown previously that NheB as well as NheC were able to bind to Vero cells individually, however, only cells primed with NheC could be lysed by the addition of the respective other two components after a washing step [14]. In the light of the data presented here, it must be concluded that formation of functional complexes between NheB and NheC is still possible after cell binding of NheC but not after cell binding of NheB. A possible explanation is that at the relatively high concentrations used in the former study, NheB is 'unspecifically' attached to the cell surface and no longer

available for any further action. The activity of NheC, on the other hand, seems not to be influenced by cell binding and NheB, added in the second step, will be able to bind to cell bound NheC. From the experimental set-up it can, however, not be excluded that NheC is released from the cell surface during the second incubation step and that the NheB-NheC complexes are formed in solution.

According to the current model, the first step in the mode of action of Nhe is associated with binding of NheC and NheB to the cell surface [14]. The data presented here allow a more detailed view on this first step and we propose the following refined model. Assuming that the three Nhe components are secreted individually using the Sec pathway, the first step outside the bacterial cell will be the formation of stable complexes between NheB and NheC. The NheB-NheC complexes will then bind to the cell surface, probably to a specific surface structure recognizing the NheB-NheC complex as well as free NheC, but not free NheB. This step will be accompanied by conformational changes [30], which allow subsequent attachment of free NheB but not of NheB-NheC complexes. Binding and oligomerization of a sufficient amount of free NheB are necessary to form a ring-shaped structure. Following this step, NheA will be able to bind to cell-bound NheB and complete the trans-membrane pore.

Nhe belongs to the α -helical pore-forming toxins with structural similarity to ClyA [11]. In general, pore-forming toxins are secreted as soluble proteins, which bind to the target cell, oligomerize on the cell membrane and finally form a transmembrane channel [31,32]. Among pore-forming toxins, Nhe is one of the very few known toxin complexes requiring three different proteins for cytotoxic action. Here we describe another fascinating aspect of Nhe, namely the complex formation between two of its components in solution before cell binding. The specific interaction between NheB and NheC represents an important step during the complex mode of action of Nhe and elucidation of the structural and biochemical properties of this protein-protein interaction will be an essential step to provide an overall model explaining pore formation by Nhe.

SUPPORTING INFORMATION**Figure S1****SYPRO Ruby stained SDS-PAGE showing purified rNheC.**

Lane 1 and 2, IAC flow-through of two independent lysates; lane 3 and 4, eluted rNheC at 37 kDa; lane 3 is corresponding to flow-through of lane 1, lane 4 is related to lane 2; lane 5, BSA at 66 kDa (adjusted to 5 $\mu\text{g ml}^{-1}$) as a standard for quantification.

doi:10.1371/journal.pone.0063104.s001

NheC ¹⁾	MQKRFYKKCLLAVMIAGVATSNAFFLHPFAAEQNVKVL-----QENV	42
NheC ²⁾	MQKRFYKKCLLTLMIAGVATSNAFFLHTFAAEQNVKIQ-----QENA	42
NheB ³⁾	MTKKPYKVMALSALMAVFAAGNIMPAHTYAAESTVKQAPVHAVAKAYNDY	50
NheB ⁴⁾	MTKKPYKVMALSALMAVFTAGNIMPAHTYAAESTVKQAPVHAVAKAYNDY	50
	* *: ** *: **: * :*: * :*: ** :*	
NheC	KNYSLGPAGFQDVMQQTSSIFAMDSYAKLIQNQQETDLSKISSINSEFK	92
NheC	NDYSLGPAGFQDVMQQTSSIFAMDSYAKLIQNQQETDLSKISSINGELK	92
NheB	EEYSLGPEGLKDAMERTGSNALVMDLYALTIIKQGNVNFNGNVSSVDAALK	100
NheB	EEYSLGPEGLKDAMERTGSNALVMDLYALTIIKQGNVNFNGNVSSVDAALK	100
	:*: ** *: *: * :*: ** * :* :*: **: *: *	
NheC	GNMIQHQRDAKINAAYWLNMMKPQIMKTDQNIINYNNTFQSYNDMLIAI	142
NheC	GNMIQHQRDAKMNAAYWLNSMKPQIMKTDQNIINYNNTFQSYNDMLIAI	142
NheB	GKVIQHQRDTARGNAKQWLDVLKPQLISTNQNIINYNTKFQNYDYLVAAY	150
NheB	GKVIQHQRDTARGNAKQWLDVLKPQLISTNQNIINYNTKFQNYDYLVAAY	150
	*: ** *: ** *: *: *: *: *: *: *: *: *	
NheC	DQKDSGKLGKADLEKLYADIVKNQNEVDGLLGNLKSFRDRMAKDTNSFKED	192
NheC	DQKDSGKLGKADLEKLYADIVKNQNEVDGLLGNLKAFRDRMAKDTNSFKED	192
NheB	DAKDKATLTKGLTRLSSSINENKAQVDQLVEDLKKFRNKMTSDTQNFKGD	200
NheB	DAKDKATLTKGLTRLSSSINENKAQVDQLVEDLKKFRNKMTSDTQNFKGD	200
	* ** :*. * :* :*: *: *: *: *: *: *: *	
NheC	TNQLTAILASTNAGIPALEQQINTYNDSIKKSNDMVI-----	229
NheC	TNQLTAILASTNAGIPALEQQINTYNDSIKKSNDMVI-----	229
NheB	ANQITSILASQDAGIPLLQNQITTYNEAISKYNAIIGSSVATALGPIAI	250
NheB	ANQITSILASQDAGIPLLQNQITTYNEAISKYNAIIGSSVATALGPIAI	250
	:*: *: ** *: ** *: *: *: *: *: *: *	
NheC	-----AGGVLCVALIT---CLAGG--PMIAVAKKDIANAEEGEIAN	264
NheC	-----AGGVLCVALIT---CLAGG--PMIAVAKKDIANAEREIAN	264
NheB	IGGAVVIATGAGTPLGVALIAGGAAVGGGTAGIVLAKKELDNAQAEIQK	300
NheB	IGGAVVIATGAGTPLGVALIAGGAAVGGGTAGIVLAKKELDNAQAEIQK	300
	* * * *: . *. * :*: *: *: *	
NheC	LKDRISGAQAEVVILTDVKNKTTNMTETIDAAITALQNISNQWYTVGAKY	314
NheC	LKDRISGAQAEVAILTDVKNKTTNMTETIDAAITALQNISNQWYTVGAKY	314
NheB	ITGQVTTAQLEVAGLTNIKTQTEYLTNTIDTAITALQNISNQWYTMGSKY	350
NheB	ITGQVTTAQLEVAGLTNIKTQTEYLTNTIDTAITALQNISNQWYTMGSKY	350
	:*: *: ** *: *: * :*: *: *: *: *: *: *	
NheC	NNLLQNVKGITPEEFTFIKEDLHTAKDSWKDVKDYTEKLHEGVAK-----	359
NheC	NNLLQNVKGITPEEFTFIKEDLHTAKDSWKDVKDYTEKLHEGVAK-----	359
NheB	NSLLQNVDSISPNDLVFIKEDLNIKDSWKNIKDYAEKIYAEDIKVVDTKKA	402
NheB	NSLLQNVDSISPNDLVFIKEDLNIKDSWKNIKDYAEKIYAEDIKVVDTKKA	402
	* . ** *: *: *: *: *: *: *: *: *: *	

¹⁾ GenBank accession code: CAB53340.2 (NVH 1230/88)

²⁾ GenBank accession code: AAZ82473.1 (NVH 0075/95)

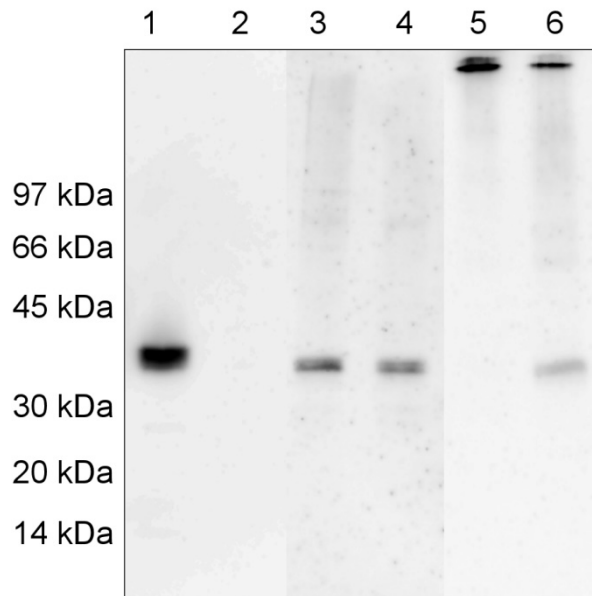
³⁾ GenBank accession code: CAB53339.2 (NVH 1230/88)

⁴⁾ GenBank accession code: AAZ82472.1 (NVH 0075/95)

Figure S2

Clustal alignment of NheC (derived from *B. cereus* strains NVH 1230/88 and NVH 0075/95) and NheB (derived from *B. cereus* strains NVH 1230/88 and NVH 0075/95).

doi:10.1371/journal.pone.0063104.s002

**Figure S3****Western immunoblot showing lability of B-C-oligomers under SDS-PAGE conditions.**

Lanes 1 and 3, purified rNheC and NheB mixed at a molar ratio of 1:1; lanes 2 and 4, purified rNheC as a control. Lanes 1 and 2, detection by NheB-specific MAb 1E11 (NheB at 39 kDa). Lanes 3 and 4, detection by NheC-specific MAb 3D6 (NheC at 37 kDa). Lanes 5 and 6, crosslinking of NheB and rNheC mixed at a molar ratio of 1:1 (lane 5) and 1:2 (lane 6); detection by NheC-specific MAb 3D6; crosslinked B-C-complexes at the top of lanes 5 and 6. doi:10.1371/journal.pone.0063104.s003

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Brunhilde Minich, Franziska Witzko, and Stephanie Strassner for excellent technical assistance. Special acknowledgements go to Dr. Eva-Lotta von Rüden for excellent instructions to the Zeiss LSM 510 microscope by courtesy of the Institute of Pharmacology, Toxicology, and Pharmacy, Ludwig-Maximilians-Universität München, Germany.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Revised the manuscript: RD TL PG EM. Conceived and designed the experiments: EM RD AD. Performed the experiments: UH RD AD KZ. Analyzed the data: UH RD AD KZ TL PG EM. Contributed reagents/materials/analysis tools: TL PG. Wrote the paper: UH RD AD EM.

REFERENCES

1. Schoeni JL, Wong AC (2005) *Bacillus cereus* food poisoning and its toxins. J Food Prot 68: 636-648.
2. Stenfors Arnesen LP, Fagerlund A, Granum PE (2008) From soil to gut: *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. FEMS Microbiol Rev 32: 579-606.
3. Agata N, Ohta M, Mori M, Isobe M (1995) A novel dodecadepsipeptide, cereulide, is an emetic toxin of *Bacillus cereus*. FEMS Microbiol Lett 129: 17-20.
4. Lund T, De Buyser ML, Granum PE (2000) A new cytotoxin from *Bacillus cereus* that may cause necrotic enteritis. Mol Microbiol 38: 254-261.
5. Beecher DJ, Wong ACL (1994) Improved purification and characterization of hemolysin BL, a hemolytic dermonecrotic vascular permeability factor from *Bacillus cereus*. Infect Immun 62: 980-986.
6. Beecher DJ, Schoeni JL, Wong ACL (1995) Enterotoxic activity of hemolysin BL from *Bacillus cereus*. Infect Immun 63: 4423-4428.
7. Lund T, Granum PE (1996) Characterisation of a non-haemolytic enterotoxin complex from *Bacillus cereus* isolated after a foodborne outbreak. FEMS Microbiol Lett 141: 151-156.

8. Granum PE, Brynestad S, Kramer JM (1993) Analysis of enterotoxin production by *Bacillus cereus* from dairy products, food poisoning incidents and non-gastrointestinal infections. *Int J Food Microbiol* 17: 269-279.
9. Granum PE, O'Sullivan K, Lund T (1999) The sequence of the non-haemolytic enterotoxin operon from *Bacillus cereus*. *FEMS Microbiol Lett* 177: 225-229.
10. Lindbäck T, Fagerlund A, Rodland MS, Granum PE (2004) Characterization of the *Bacillus cereus* Nhe enterotoxin. *Microbiology* 150: 3959-3967.
11. Fagerlund A, Lindbäck T, Storset AK, Granum PE, Hardy SP (2008) *Bacillus cereus* Nhe is a pore-forming toxin with structural and functional properties similar to the ClyA (HlyE, SheA) family of haemolysins, able to induce osmotic lysis in epithelia. *Microbiology* 154: 693-704.
12. Madegowda M, Eswaramoorthy S, Burley SK, Swaminathan S (2008) X-ray crystal structure of the B component of Hemolysin BL from *Bacillus cereus*. *Proteins* 71: 534-540.
13. Mueller M, Grauschopf U, Maier T, Glockshuber R, Ban N (2009) The structure of a cytolytic alpha-helical toxin pore reveals its assembly mechanism. *Nature* 459: 726-730.
14. Lindbäck T, Hardy SP, Dietrich R, Sodring M, Didier A, et al. (2010) Cytotoxicity of the *Bacillus cereus* Nhe enterotoxin requires specific binding order of its three exoprotein components. *Infect Immun* 78: 3813-3821.
15. Dietrich R, Moravek M, Bürk C, Granum PE, Märklbauer E (2005) Production and characterization of antibodies against each of the three subunits of the *Bacillus cereus* nonhemolytic enterotoxin complex. *Appl Environ Microbiol* 71: 8214-8220.
16. Lapidus A, Goltsman E, Auger S, Galleron N, Segurens B, et al. (2008) Extending the *Bacillus cereus* group genomics to putative food-borne pathogens of different toxicity. *Chem Biol Interact* 171: 236-249.
17. Didier A, Dietrich R, Gruber S, Bock S, Moravek M, et al. (2012) Monoclonal antibodies neutralize *Bacillus cereus* Nhe enterotoxin by inhibiting ordered binding of its three exoprotein components. *Infect Immun* 80: 832-838.
18. Dietrich R, Fella C, Strich S, Märklbauer E (1999) Production and characterization of monoclonal antibodies against the hemolysin BL enterotoxin complex produced by *Bacillus cereus*. *Appl Environ Microbiol* 65: 4470-4474.

19. Stadler V, Felgenhauer T, Beyer M, Fernandez S, Leibe K, et al. (2008) Combinatorial synthesis of peptide arrays with a laser printer. *Angew Chem Int Ed Engl* 47: 7132-7135.
20. Friguet B, Djavadiohanian L, Pages J, Bussard A, Goldberg M (1983) A convenient enzyme-linked immunosorbent-assay for testing whether monoclonal-antibodies recognize the same antigenic site - application to hybridomas specific for the beta-2-subunit of *Escherichia coli* tryptophan synthase. *J Immunol Methods* 60: 351-358.
21. Moravek M, Dietrich R, Bürk C, Broussolle V, Guinebretiere MH, et al. (2006) Determination of the toxic potential of *Bacillus cereus* isolates by quantitative enterotoxin analyses. *FEMS Microbiol Lett* 257: 293-298.
22. Gohar M, Gilois N, Graveline R, Garreau C, Sanchis V, et al. (2005) A comparative study of *Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus anthracis* extracellular proteomes. *Proteomics* 5: 3696-3711.
23. Fagerlund A, Brillard J, Fürst R, Guinebretière MH, Granum PE (2007) Toxin production in a rare and genetically remote cluster of strains of the *Bacillus cereus* group. *BMC Microbiol* 7: 43.
24. Guinebretiere MH, Broussolle V, Nguyen-The C (2002) Enterotoxigenic profiles of food-poisoning and food-borne *Bacillus cereus* strains. *J Clin Microbiol* 40: 3053-3056.
25. Hansen BM, Hendriksen NB (2001) Detection of enterotoxigenic *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* strains by PCR analysis. *Appl Environ Microbiol* 67: 185-189.
26. Wehrle E, Moravek M, Dietrich R, Bürk C, Didier A, et al. (2009) Comparison of multiplex PCR, enzyme immunoassay and cell culture methods for the detection of enterotoxigenic *Bacillus cereus*. *J Microbiol Methods* 78: 265-270.
27. Ehling-Schulz M, Svensson B, Guinebretière MH, Lindbäck T, Andersson M, et al. (2005) Emetic toxin formation of *Bacillus cereus* is restricted to a single evolutionary lineage of closely related strains. *Microbiology* 151: 183-197.
28. Gohar M, Faegri K, Perchat S, Ravnum S, Okstad OA, et al. (2008) The PlcR virulence regulon of *Bacillus cereus*. *PLoS ONE* 3: e2793.
29. Fagerlund A, Lindbäck T, Granum PE (2010) *Bacillus cereus* cytotoxins Hbl, Nhe and CytK are secreted via the Sec translocation pathway. *BMC Microbiol* 10: 304.
30. Phung D, Granum PE, Dietrich R, Märklbauer E, Hardy SP (2012) Inhibition of cytotoxicity by the Nhe cytotoxin of *Bacillus cereus* through the interaction of dodecyl maltoside with the NheB component. *FEMS Microbiol Lett* 330: 98-104.

31. Iacovache I, van der Goot FG, Pernot L (2008) Pore formation: An ancient yet complex form of attack. *Biochim Biophys Acta-Biomembr* 1778: 1611-1623.
32. Bischofberger M, Iacovache I, van der Goot FG (2012) Pathogenic Pore-Forming Proteins: Function and Host Response. *Cell Host Microbe* 12: 266-275.
33. Arnold K, Bordoli L, Kopp J, Schwede T (2006) The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling. *Bioinformatics* 22: 195-201.
34. Bordoli L, Kiefer F, Arnold K, Benkert P, Battey J, et al. (2009) Protein structure homology modeling using SWISS-MODEL workspace. *Nat Protoc* 4: 1-13.
35. Bordoli L, Schwede T (2012) Automated protein structure modeling with SWISS-MODEL Workspace and the Protein Model Portal. *Methods Mol Biol* 857: 107-136.

IV DISKUSSION

Bacillus cereus hat in den letzten Jahren als einer der wichtigsten Verursacher lebensmittelassoziierter Erkrankungen an Bedeutung gewonnen. Als hauptursächliche Pathogenitätsfaktoren *B. cereus*-bedingter Durchfallerkrankungen wurden das Einzeltoxin CytK (Lund et al., 2000), sowie die beiden Enterotoxinkomplexe Hbl (Beecher & Macmillan, 1991) und Nhe (Lund & Granum, 1996) identifiziert. Nachdem neuere *B. cereus*-Studien verdeutlicht hatten, dass das Non-haemolytic Enterotoxin (Nhe) der maßgebende Virulenzfaktor für die zytotoxische Wirkung der untersuchten Erregerstämme ist (Dietrich et al., 2005; Moravek et al., 2006), lag der Forschungsschwerpunkt in der Folge verstärkt auf der Wirkungsweise des Nhe-Enterotoxinkomplexes.

Nhe ist neben dem Hbl-Enterotoxinkomplex insofern einzigartig, als dass deren zytotoxisches Potential auf drei Einzelkomponenten beruht. In der Literatur finden sich allenfalls Beschreibungen von binären Toxinen, beispielsweise die aus einer porenbildenden Untereinheit B und einer enzymatisch wirksamen Untereinheit A gebildeten Toxinkomplexe von *Bacillus anthracis* (Young & Collier, 2007) oder *Vibrio cholerae* (Vanden Broeck et al., 2007), welche der sogenannten AB-Familie (Cabiaux et al., 1997) zugehörig sind. Untersuchungen zum Wirkmechanismus von Nhe zeigten, dass sich nur bei einem bestimmten molaren Verhältnis (10:10:1) von NheA:NheB:NheC (Lindbäck et al., 2004) und einer definierten Bindungsreihenfolge der Einzelkomponenten an die Zelle, die maximale zytotoxische Aktivität dieses Enterotoxins manifestiert (Lindbäck et al., 2010; Didier et al., 2012). Während für Hbl ein sogenannter „membrane attack complex“ postuliert wurde (Beecher & Wong, 1997), lassen neuere Erkenntnisse zum Wirkmechanismus von Nhe vermuten, dass es kolloidosmotische Zelllyse durch Porenbildung hervorruft (Fagerlund et al., 2008). Die genauen molekularen Interaktionen, und ob hierbei eine Abhängigkeit von zellulären Parametern oder von einem Zelloberflächenrezeptor besteht, konnten noch nicht geklärt werden. Mit Hilfe der von Dietrich et al. (2005) produzierten monoklonalen Antikörper (mAk) gegen NheA und NheB konnten entscheidende Erkenntnisse zur Bindungsreihenfolge der drei Nhe-Komponenten an Zellen gewonnen werden (Lindbäck et al., 2010; Didier et al., 2012). Von besonderem Interesse war dabei die Tatsache, dass für maximale Zytotoxizität das NheC im ersten Inkubationsschritt vorhanden sein muss, entweder als Einzelkomponente oder in Form eines mit NheB zuvor in Lösung gebildeten Komplexes.

Um die Rolle des NheC sowie die Bedeutung der NheB-NheC-Interaktion weiter analysieren zu können, war es Aufgabe dieser Arbeit, NheC-spezifische monoklonale Antikörper herzustellen, zu charakterisieren und deren Eignung zur weiteren Aufklärung des Nhe-Wirkmechanismus zu überprüfen.

Im Verlauf vorangegangener Studien gelang es bereits mAk gegen die Toxinkomponenten NheA und NheB zu produzieren. Für NheC stand hingegen bislang nur ein polyklonales (Kaninchen-) Antiserum zur Verfügung (Dietrich et al., 2005), mit dem in früheren Untersuchungen erstmals die NheC-Expression durch *B. cereus*-Stämme nachgewiesen werden konnte. Die bislang beschriebenen mAk zum Nachweis von NheA und NheB konnten nach Immunisierung von Mäusen mit grob gereinigten *B. cereus* Nhe-Produzenten gewonnen werden; dieser Ansatz führte jedoch in Hinblick auf die Etablierung von NheC-spezifischen mAk zu keinem Erfolg (Dietrich et al., 2005). Daher galt es in einem ersten Schritt für die Immunisierung von Mäusen ausreichende Mengen an gereinigtem NheC herzustellen.

Die einzelnen Enterotoxinkomponenten durch klassisch chromatographische Verfahren aus *B. cereus*-Kulturüberständen zu gewinnen, hat sich in der Vergangenheit als problematisch erwiesen. Neben dem beachtlichen Arbeitsaufwand, der sich aufgrund der Zusammensetzung der Enterotoxinkomplexe aus jeweils drei Einzelproteinen ergibt, wurden die Untersuchungen durch Verlust der toxischen Aktivität und durch Instabilität der gewonnenen Toxinpräparationen behindert (Beecher & Wong, 1994b; Lund & Granum, 1996; Lund & Granum, 1997). Zudem war es vor der Entwicklung des oben genannten polyklonalen (Kaninchen-) Antiserums (Dietrich et al., 2005) nicht gelungen, freies NheC in *B. cereus*-Überständen zu detektieren (Gohar et al., 2002; Lindbäck et al., 2004). Dies ist möglicherweise durch eine in diversen Studien festgestellte, wesentlich geringfügigere Expression (ca. Faktor 10) der dritten Nhe-Komponente im Vergleich zu NheA und NheB zu erklären (Lindbäck et al., 2004; Moravek et al., 2006). Granum et al. (1999) und Lindbäck et al. (2004) postulierten als mutmaßliche Ursache hierfür eine potentielle Schleifenbildung zwischen *nheB* und *nheC* auf mRNA-Ebene, sowie eine Hemmung der Translation aufgrund dieser Sekundärstruktur nahe oder direkt an der Ribosomenbindungsstelle. Um für Immunisierungs- und Boosterinjektionen von Mäusen in relativ kurzen Zeitabständen stabiles und toxisch aktives NheC in ausreichenden Mengen herzustellen, musste deshalb eine geeignetere Produktionsmethode eingesetzt werden. Als besonders qualifiziert im Hinblick auf eine hohe Ausbeute und relativ schnelle Verfügbarkeit (Schmidt, 2004; Terpe, 2006), erschien für diese Zwecke die Herstellung von rekombinantem NheC (rNheC) in einem bakteriellen Expressionssystem. Hierfür wurde dem Lehrstuhl freundlicherweise von

Prof. P. E. Granum (Oslo) ein Plasmid zur Verfügung gestellt, welches aus *B. cereus*-Stamm NVH 1230/88 (Granum et al., 1993) isoliertes *nheC* mit N-terminalem Hexa-Histidin-Tag (His-Tag) enthielt (Lindbäck et al., 2004). Das Plasmid wurde im Vorfeld dieser Arbeit in das für die Expression rekombinanter Proteine etablierte *E. coli*-System BL21(DE3)pLysS, mit dem meistgebräuchlichen *lac*-Promotor-kontrollierten T7-RNA-Polymerase-Expressionssystem (Studier & Moffatt, 1986; Terpe, 2006) eingeschleust. Die Genexpression wird in diesem System mit Isopropyl- β -D-1-thiogalaktopyranosid (IPTG) positiv reguliert (Baneyx, 1999). Um zu verhindern, dass zu hohe Zelldichten Plasmidverluste und damit gegebenenfalls geringere Expressionsleistung bewirken (Baneyx, 1999), wurde die Genexpression bei einer photometrisch bestimmten OD₆₀₀ von 0,4–0,6 induziert.

Bei der Überexpression rekombinanter Proteine in gramnegativen *E. coli*, akkumulieren diese zumeist in Zytoplasma oder Periplasma als unlösliche Aggregate in Einschlusskörperchen, den sogenannten „inclusion bodies“ (Bowden & Georgiou, 1990). Eine vollständige Isolierung rekombinant hergestellter Proteine aus solchen Einschlusskörperchen kann typischerweise durch die hier erfolgreich angewandten Denaturierungsprozesse erfolgen. Wie bereits von Lindbäck et al. (2004) beschrieben, waren denaturierende Verfahren mittels hochmolaren Harnstoffs (8 M Urea) unter alkalischen Bedingungen (pH 8,0) notwendig, um das in *E. coli* exprimierte rNheC als Monomer und somit in funktionell aktiver Form zu gewinnen. Um die „inclusion bodies“ optimal aus den Zellen herauszulösen, wurden diese zusätzlich mechanisch durch Frieren und Tauen sowie Ultraschallbehandlungen aufgeschlossen. Bereits im Rahmen einer früheren Dissertation am Lehrstuhl hatte sich gezeigt, dass das per se hydrophobe rNheC infolge Überexpression dazu neigt, Dimere zu bilden (Gruber, 2009). Während es gelungen war, monomeres NheA und NheB ohne *Bacillus*-Leadersequenz rekombinant in *E. coli* herzustellen, trat bei den verschiedenen überprüften rekombinanten NheC-Varianten (mit C-terminalem bzw. ohne His-Tag) auch bei Einsatz verschiedener Vektorsysteme, unterschiedlicher Dialyseverfahren oder anderer Lyse-Reagenzien immer eine Dimer-Bildung auf. Diese Dimere erwiesen sich als zytotoxisch inaktiv. Erst durch die Verwendung des oben erwähnten Plasmids mit N-terminalem Hexa-Histidin-Tag (Prof. P. E. Granum, Oslo) und dessen Expression in *E. coli* BL21(DE3)pLysS mit anschließenden Denaturierungsverfahren und absteigender Urea-Dialyse, konnte rNheC in monomerer und biologisch aktiver Form gewonnen werden.

Darauf aufbauend wurden in der vorliegenden Arbeit zunächst die Anzucht- und Herstellungsbedingungen optimiert, um anschließend auf kostengünstige Weise unter Verwendung diverser affinitätschromatographischer Aufreinigungsverfahren möglichst große

Mengen reinen rNheCs zu erhalten. Um korrekt zurückgefaltete und biologisch aktive Proteine zu erhalten, sollten den genannten Denaturierungsprozessen in der Regel möglichst schonende Renaturierungsverfahren folgen. Im Gegensatz zu den bisher angewandten Dialyseverfahren durch absteigende Urea-Konzentrationen (Lindbäck et al., 2004), konnte im Laufe dieser Studie jedoch eine schnellere und kostengünstigere Variante mittels reiner PBS-Dialyse erfolgreich etabliert werden. Zum Nachweis funktioneller Aktivität wurden Zytotoxizitätstests unter Verwendung von Verozellen durchgeführt, basierend auf dem für maximale biologische Aktivität des Nhe-Komplexes erforderlichen molaren Verhältnisses von 10:10:1 der Komponenten NheA:NheB:NheC (Lindbäck et al., 2004). Verdünnungsreihen von rNheC wurden hierbei durch die natürliche *B. cereus*-Mutante MHI 1672 ergänzt, welche ein Stopcodon am 5'-Ende des *nheC*-Gens aufweist und somit nur NheA und NheB produziert (Lindbäck et al., 2010). Sowohl für das durch PBS-Dialyse gewonnene rNheC-Dialysat, als auch für das im Anschluss daraus mittels Affinitätschromatographie aufgereinigte rNheC, konnte in den Zytotoxizitätstests eine hohe biologische Aktivität gezeigt werden.

Bei dem im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Plasmid erfolgt die Expression des rekombinanten NheC als Fusionsprotein (Baneyx, 1999) mit einem Hexa-Histidin-Tag, der prinzipiell eine Aufreinigung des rNheC-Dialysats mittels immobilisierter Metallionen-Affinitätschromatographie (IMAC), auch Metallchelatchromatographie genannt (Porath et al., 1975), ermöglicht. Vorversuche zeigten, dass dieses Aufreinigungsverfahren methodisch relativ einfach durchführbar ist, und das eluierte rNheC auch die gewünschte biologische Aktivität besitzt. Detailliertere Untersuchungen mittels Western Immunblot, Photometrie und SYPRO[®] Ruby Protein Gel Stain zeigten jedoch zwei wesentliche Nachteile dieses Verfahrens auf. Zum einen wurden maximal 50 % des exprimierten rNheC gebunden, während sich die andere Hälfte im Probendurchlauf wiederfand. Auch durch wiederholtes Beschicken nach Regeneration bzw. Äquilibration des Agarosegels konnte kein weiteres Protein gebunden werden. Diese Verluste könnten unter anderem darauf zurückzuführen sein, dass die im Bereich zwischen dem N-terminalen His-Tag und maturem NheC zusätzlich exprimierte *Bacillus*-Leadersequenz durch Proteasen abgespalten wurde, was zur Folge hatte, dass der Anteil an rekombinantem Protein ohne His-Tag nicht mehr binden konnte. Für weitere Verluste könnte möglicherweise auch die Tendenz des rNheC zur Bildung von intermolekularen Disulfid-Brücken verantwortlich sein, was zu einer Blockade des His-Tags geführt haben könnte. Als weiterer Nachteil des IMAC-Verfahrens für die Aufreinigung von rNheC ist die Verunreinigung des Eluats mit Fremdproteinen aufzuführen. Die Gründe hierfür

blieben unklar, prinzipiell können Proteine mit Ni^{2+} -Affinität unspezifisch an die Ni^{2+} -Sephrose-Matrix binden. Möglich wäre auch eine Bindung von Fremdproteinen über Disulfidbrücken an die Cysteine des rNheC.

Parallel zu den anfänglichen Aufreinigungen über Ni^{2+} -NTA-Affinitätschromatographie wurde das von Dietrich et al. (2005) am Lehrstuhl entwickelte NheC-spezifische polyklonale (Kaninchen-) Antiserum als affinitätschromatographisch gereinigter anti-Peptid-Antikörper an CNBr-aktivierte Sepharose 4B gekoppelt, um rNheC mittels Immunaффinitätschromatographie (IAC) aufzureinigen. Vorteil der Immunaффinitätschromatographie ist die spezifische und reversible Bindung zwischen Antikörper und Antigen. Die Aufreinigung über eine IAC-Säule erwies sich als die vergleichsweise effizientere und selektivere Alternative und wurde damit zur Methode der Wahl. Da das polyklonale Kaninchen-Antiserum an den C-Terminus der NheC-Aminosäuresequenz bindet, konnte so nicht nur rNheC mit His-Tag gebunden werden, sondern auch rNheC dessen His-Tag proteolytisch abgespalten war. Dies wurde durch Versuche untermauert, in denen das in Ni^{2+} -NTA-Agarose-Probendurchläufen enthaltene rNheC-Material nahezu restlos mittels IAC-Säule gebunden und anschließend erfolgreich eluiert werden konnte.

Beim rNheC-Nachweis mittels Western-Immunblot unter Verwendung des NheC-spezifischen (Kaninchen-) Antiserums als primärem Antikörper trat aufgrund der unterschiedlichen Ausprägung des His-Tags regelmäßig eine Doppelbande auf, wobei immunaффinitätschromatographisch gereinigtes rNheC eine starke Bande auf der dem NheC-Molekulargewicht entsprechenden Höhe von ca. 37 kDa [36,5 kDa; (Granum et al., 1999)] und lediglich eine schwache Bande bei ca. 40 kDa zeigte. Bei mittels Ni^{2+} -NTA-Affinitätschromatographie gereinigtem rNheC war hingegen die 40 kDa-Bande deutlich intensiver präsent. Im Rahmen der Quantifizierung der IAC-gereinigten NheC-Präparate durch SYPRO[®] Ruby Protein Gel Stain, wurden zudem keine gröberen Verunreinigungen mehr detektiert. Jedoch konnte auch bei Anwendung der IAC rNheC nicht vollständig gebunden werden, d. h. im IAC-Probendurchlauf war noch NheC nachweisbar. Dies lässt sich vermutlich durch eine teils nicht korrekte Rückfaltung des Proteins in seine native Tertiärstruktur oder durch die Ausbildung von Oligomeren erklären. Beide Möglichkeiten könnten dazu führen, dass das vom NheC-spezifischen Antiserum erkannte C-terminale Epitop nicht mehr für die Antikörper frei verfügbar ist.

Im Vorfeld dieser Arbeit hatten sich die bisher am Lehrstuhl hergestellten, ungereinigten rNheC-Präparationen bei Kühlschranktemperatur lediglich für wenige Wochen als stabil

erwiesen. Das im Rahmen dieser Studie mittels IAC aufgereinigte rNheC (in PBS-Lösung) zeigte sich jedoch ohne jeglichen Zusatz von Proteaseblockern noch nach einer Lagerung bis zu über einem Jahr als biologisch aktiv. Dies konnte auch für die unter optimierten Anzucht- und Herstellungsbedingungen gewonnenen ungereinigten rNheC-Präparationen (in PBS-Lösung) festgestellt werden. Wichtig war zum einen die konsequente Einhaltung einer Lagerungstemperatur von 4 °C, sowie zum anderen die Aufbewahrung in Glasbehältnissen, da NheC aufgrund seiner hydrophoben Eigenschaften bei Kontakt mit diversen Kunststoffmaterialien unspezifisch adsorbiert wird. Im Gegensatz zu NheA und NheB ist eine Lagerung des rNheC bei -20 °C nicht zu empfehlen, da dies den Verlust der biologischen Aktivität zur Folge hat; das heißt, nach dem Einfrieren von rNheC war für Nhe im Zellkulturtest keine biologische Aktivität mehr nachweisbar.

Das rekombinant in *E. coli* exprimierte und affinitätschromatographisch aufgereinigte rNheC wurde erfolgreich als Immunogen eingesetzt. Insgesamt konnten vier Hybridom-Zelllinien etabliert werden, die monoklonale Antikörper vom IgG-Subtyp (mAk 2G8, 1E12 und 2F10) sowie vom IgM-Subtyp (mAk 3D6, IgM-Monomer) gegen NheC sezernierten. Die Charakterisierung der mAk erfolgte zunächst mittels Enzymimmuntests (EIAs), Western Immunblots und Immunfluoreszenzmikroskopie. Bei Verwendung eines indirekten EIAs erlaubten die mAk den sensitiven Nachweis von NheC im unteren Nanogramm-Bereich. Da NheC Sequenzhomologien zu NheA (20 %) und NheB (44 %) aufweist (Fagerlund et al., 2008), wurden mittels indirekter EIAs und Western Immunblots Untersuchungen zur Spezifität der mAk innerhalb des Nhe-Komplexes durchgeführt. Diese ergaben, dass die mAk 3D6 und 2F10 spezifisch mit NheC reagieren, während die mAk 2G8 und 1E12 substantielle Kreuzreaktionen zur strukturverwandten Enterotoxinkomplex-Komponente NheB zeigten. Weiterführende Epitopanalysen konnten dies noch verdeutlichen. Zunächst war es möglich, die Epitope der mAk 2G8 und 1E12 bereits in indirekten Enzymimmuntests mittels der erst kürzlich beschriebenen rNheB-Deletionsmutanten (Didier et al., 2012) im Bereich des NheB-Fragments N3 (N-terminal 92 Aminosäuren deletiert) sehr gut einzugrenzen. Eine extern durchgeführte Epitopkartierung gemäß Stadler et al. (2008) erbrachte schließlich noch genauere Ergebnisse für die Bindungsstellen der mAk 2G8 und 1E12, sowie zusätzlich die Epitope der mAk 3D6 und 2F10. Für weiterführende Studien zur Rolle des NheC bzw. hinsichtlich des Wirkmechanismus („mode of action“) von Nhe, erschienen die letzteren beiden mAk aufgrund ihrer Spezifität für NheC bestens geeignet. Im Hinblick auf die Eignung der mAk für den Nachweis von NheC aus natürlichen *B. cereus*-Überständen ist jedoch zu berücksichtigen, dass der mAk 2F10 selektiv nur die NheC-

Komponente derjenigen *B. cereus*-Stämme erkennt, welche im Bereich seiner Bindungsstelle der Sequenz von *B. cereus* NVH 1230/88 (GenBank accession code 1CAB53340.2) entspricht. Damit ist für ein allgemeines Screening sicherlich der mAk 3D6 zu favorisieren. Alignments verschiedener in den Sequenz-Datenbanken veröffentlichter *nheC*-Sequenzen veranschaulichten, dass bei vielen *B. cereus*-Stämmen im nahe des N-Terminus gelegenen mAk 2F10-Epitop häufig Mutationen auftreten. Dies ist auch der Grund dafür, dass mAk 2F10 weder in EIAs, noch Western Immunblots Reaktion mit dem Referenzstamm NVH 0075/95 (GenBank accession code AAZ82473) zeigte, jedoch eine deutliche Reaktivität mit NVH 1230/88 und dem daraus generierten rNheC auftrat.

Die Epitopkartierung für den mit NheB kreuzreagierenden mAk 1E12 ergab neben einem Bindungsbereich, welcher das Epitop des ebenfalls mit NheB kreuzreagierenden mAk 2G8 einschließt, ein eher polyklonales Reaktionsmuster. Die Beobachtung, dass der mAk 1E12 zwar im Enzymimmunttest ähnlich starke Kreuzreaktivität mit NheB zeigte wie der mAk 2G8, aber im Western Immunblot deutlich schwächer reagierte, weist zudem darauf hin, dass dieser Antikörper ein diskontinuierliches Konformations-Epitop erkennt, welches in denaturiertem Zustand (nach Kochen mit SDS) nicht mehr vorhanden ist.

Eine genaue Bestimmung der Epitope innerhalb der *nheC*-Sequenz war auch insofern von Interesse, um anhand ihrer Lage innerhalb des NheC-Strukturmodells möglicherweise die Wirkungsweise des Nhe-Komplexes (Fagerlund et al., 2008) bzw. die Interaktion seiner Einzelkomponenten besser verstehen zu können. Die hypothetischen NheC- und NheB-Strukturmodelle basieren, aufgrund der Sequenzhomologien zwischen Nhe und Hbl (Fagerlund et al., 2008), auf dem mittels Röntgenstrukturanalyse ermittelten Hbl-B-Modell (Madegowda et al., 2008). Derzeit ist die Röntgenstrukturanalyse der NheA-Komponente (Phung et al., 2012a) mit verbundener Erstellung eines NheA-Modells kurz vor dem Abschluss (persönliche Mitteilung Prof. P. E. Granum), was für einen künftigen Abgleich der bisherigen NheB- und NheC-Modelle von besonderem Interesse sein wird. Didier et al. (2012) gelang es kürzlich, infolge von Zellexperimenten mit den NheB-spezifischen mAk 2B11 und 1E11 (Dietrich et al., 2005) sowie aufgrund der Positionierung ihrer Epitope im NheB-Strukturmodell, neue Erkenntnisse zur Rolle der drei Nhe-Einzelkomponenten zu gewinnen. Die Einhaltung einer geordneten Bindungsreihenfolge an die Zelle, in deren letzten Schritt die Bindung von NheA an zellgebundenes NheB gewährleistet sein muss, erwies sich für einen zytotoxischen Effekt als obligatorisch. Da beim mAk 1E11 zudem neutralisierende Eigenschaften nachgewiesen werden konnten, scheint der C-Terminus am NheB (Bindungsbereich des mAk 1E11) eine wesentliche Rolle für die Interaktion mit NheA zu

spielen. Von den vier im Rahmen dieser Arbeit neu generierten NheC-spezifischen monoklonalen Antikörpern war dagegen keiner in der Lage, die zytotoxische Aktivität des Nhe-Komplexes zu hemmen. Auch eine Vorinkubation des rNheC mit diesen monoklonalen Antikörpern zeigte keinen Neutralisationseffekt. Es ist daher zu vermuten, dass keiner der Antikörper direkt bzw. indirekt über eine sterische Hinderung die Interaktion von NheC mit der Zielzelle oder den beiden anderen Toxinkomponenten blockiert. Immunzytochemische Studien zeigten jedoch, dass alle vier mAk fähig sind, an zellgebundenes rNheC zu binden. Zusammen mit den fehlenden Neutralisationseigenschaften der NheC-spezifischen mAk deuteten diese Ergebnisse darauf hin, dass deren Epitope weder die Bindung von NheC an die Zielzelle hemmen können, noch eine Interaktion der drei Nhe-Komponenten. Nach Lindbäck et al. (2010) ist die im NheC-Strukturmodell enthaltene hydrophobe β -Haarnadelstruktur für die Membranbindung essentiell. Für eine potentielle Hemmung der NheC-Bindung an die Zielzelle, müsste demnach einer der NheC-spezifischen mAk in diesem Bereich liegen. Nach Lokalisierung der mAk-Epitope im NheC-Strukturmodell konnte dies jedoch ausgeschlossen werden, da die Epitope aller vier monoklonalen Antikörper deutlichen Abstand zur mutmaßlichen Transmembrandomäne inklusive der darin enthaltenen hydrophoben Haarnadelstruktur aufweisen.

Interessanterweise konnte in bisher nicht veröffentlichten Zytotoxizitätstests mit dem NheC-spezifischen polyklonalen Kaninchen-Antiserum (Dietrich et al., 2005) die Zytotoxizität von Nhe um circa 80 % neutralisiert werden. Hierzu war eine gemeinsame Vorinkubation von rNheC und NheC-spezifischem Antiserum erforderlich, während erst im nächsten Schritt die Zugabe der natürlichen *B. cereus*-Mutante MHI 1672 [produziert NheA und NheB; (Lindbäck et al., 2010)] erfolgte. Da zur Gewinnung des polyklonalen Kaninchen-Antiserums ein dem C-terminalen Ende des NheC entsprechendes Peptid eingesetzt wurde, deuten die neutralisierenden Eigenschaften des Antiserums darauf hin, dass NheB vermutlich mit dem C-terminalen Ende der NheC-Sequenz interagiert.

Im weiteren Verlauf dieser Arbeit lag der Interessensschwerpunkt auf der Komplexbildung zwischen NheB und NheC. Auf natürliche Verhältnisse übertragen, schien nach dem aktuellen Forschungsstand bezüglich des Nhe-„mode of action“ die Interaktion der B- und C-Komponente am wahrscheinlichsten in Lösung stattzufinden (Lindbäck et al., 2010). So konnte in künstlichen Systemen zwar gezeigt werden, dass sowohl NheB als auch NheC in der Lage waren, alleine an die Zellmembran zu binden. Zur Zytolyse durch den Nhe-Komplex konnte es jedoch nur kommen, wenn NheC im ersten Schritt an die Zelle gebunden hatte. Die andere Möglichkeit war, dass NheB und NheC nach Vorinkubation in Lösung gemeinsam als

Komplex mit den Zielzellen in Kontakt traten. Im Anschluss an die NheB-Bindung wurde eine notwendige Konformationsänderung seiner Tertiärstruktur vermutet, da das im letzten Schritt des „mode of action“ erforderliche NheA nur an der Zelloberfläche mit NheB zu reagieren vermag. Nach Bindung der A-Komponente kommt es zur Zelllyse infolge einer bislang noch ungeklärten Form von Porenbildung. Interessant sind hierbei die Parallelen zum strukturell sehr ähnlich aufgebauten α -PFT ClyA, dessen per Röntgenstrukturanalyse ermitteltes Modell, aufgrund seiner signifikanten Ähnlichkeiten mit dem Hbl-B-Modell (Wallace et al., 2000; Madegowda et al., 2008), in eine Reihe mit den computergenerierten NheB- und NheC-Homologiemodellen gestellt wurde (Fagerlund et al., 2008). Zwar stellt ClyA im Gegensatz zum hetero-oligomeren Nhe lediglich einen homo-oligomeren Porenbildner dar, dennoch ist es ähnlich wie Nhe ebenfalls sowohl zytolytisch, als auch hämolytisch aktiv und erzeugt große Membrankanäle. Außerdem wurde für ClyA interessanterweise kürzlich nachgewiesen, dass das wasserlösliche Monomer erst umfangreiche Konformationsänderungen erfahren muss, um eine transmembranäre Pore bilden zu können (Tzokov et al., 2006; Fagerlund et al., 2008; Mueller et al., 2009; Haug et al., 2010).

Eine Darstellung der in Lösung gebildeten NheB-NheC-Komplexe mittels Western Immunblot gestaltete sich schwierig, da sich die durch NheB und NheC gebildeten Hetero-Oligomere unter SDS-PAGE-Bedingungen als instabil erwiesen. Bereits in früheren Untersuchungen erfolgte deshalb der Nachweis dieser Komplexe indirekt unter Verwendung nativer Gele (Lindbäck et al., 2004) bzw. mittels Co-Immunpräzipitation (Lindbäck et al., 2010). In der vorliegenden Arbeit konnte die Bildung von NheB-NheC-Komplexen in Lösung durch weitere Verfahren bekräftigt werden. Ein sogenanntes intermolekulares Cross-Linking (Quervernetzen mittels eines chemischen Reagens) der beiden interagierenden Nhe-Proteine erlaubte die anschließende Darstellung der NheB-NheC-Komplex-Bildung unter denaturierenden SDS-PAGE-Bedingungen. In Western Immunblots mit mAk 3D6 konnten infolge des Cross-Linkings der beiden Nhe-Komponenten in Lösung, bei einem molaren Verhältnis von 1:1 intensive hochmolekulare Banden (Komplex-Formierung) beobachtet werden, während freies NheC nicht mehr detektierbar war. In Übereinstimmung dazu konnte unter Verwendung des NheB-spezifischen mAk 1E11 in zusätzlichen Dot Blot-Verfahren, eine von der Konzentration der NheC-Komponente abhängige, proportionale NheB-Bindung nachgewiesen werden.

All diese Nachweisverfahren waren jedoch immer auf den Einsatz gereinigter und in künstlichen Systemen kombinierter Nhe-Komponenten beschränkt. Deshalb war es von

höchstem Interesse eine Methode zu etablieren, mit der es möglich ist, NheB-NheC-Komplexe in natürlichen Überständen von *B. cereus*-Stämmen zu detektieren.

In einem ersten Anlauf wurden deshalb die neu generierten monoklonalen Antikörper gegen NheC auf ihre Eignung für den Einsatz in Sandwich-Enzymimmuntests geprüft. Alle vier mAk waren in Kombination mit dem NheC-spezifischen polyklonalen Kaninchen-Antiserum (Dietrich et al., 2005) als Fangantikörper in der Lage, gereinigtes rNheC bis zu einer Nachweisgrenze von 10 ng/ml zu detektieren. Bei der Untersuchung natürlicher *B. cereus*-Überstände mit diesem System konnten jedoch nur geringe Mengen oder sogar gar kein NheC nachgewiesen werden. Da die NheB-Konzentration der verwendeten Stämme jedoch überwiegend bei mehr als 1 µg/ml lag und frühere Studien für maximale Zytotoxizität ein molares Verhältnis von 10:1 für NheB:NheC postulierten (Lindbäck et al., 2004; Lindbäck et al., 2010), wäre für die entsprechenden NheC-Konzentrationen eine Mindestkonzentration von 0,1 µg/ml zu erwarten gewesen. Eine naheliegende Schlussfolgerung aus der Diskrepanz zwischen gemessener und theoretisch vorhandener NheC-Konzentration der getesteten *B. cereus*-Überstände war, dass mindestens eine der Bindungsstellen der beteiligten Antikörper in dieser Form des Sandwich-EIAs, aufgrund der Komplexbildung von NheB und NheC im natürlichen Kulturüberstand, nicht zugänglich war.

Um die Komplexbildung in natürlichen *B. cereus*-Überständen zweifelsfrei nachweisen zu können, wurde daraufhin erfolgreich ein neuartiger NheC/B-Sandwich-EIA etabliert. Dieser bot durch die Kombination eines NheC-spezifischen mAk (mAk 3D6) und eines enzymmarkierten mAk gegen NheB (mAk 1E11) (Dietrich et al., 2005) die Möglichkeit, an NheB gebundenes NheC nachzuweisen. Vergleicht man die Resultate des NheC-spezifischen Sandwich-EIA mit denen des NheC/B-Sandwich-EIA, kommt man zu dem Schluss, dass in natürlichen *B. cereus*-Überständen mindestens 90 % des NheC gebunden an NheB vorliegt. Eine Korrelation der in einem separat durchgeführten NheB-spezifischen Sandwich-EIA bestimmten NheB-Konzentrationen mit den Titern des NheC/B-Sandwich-EIAs konnte jedoch nicht gezeigt werden. Eine Erklärungsmöglichkeit wäre, dass eventuell die Bindungsstelle des zuerst an die Platte gebundenen NheC-spezifischen mAk 3D6 durch die Komplex-Konformation mit NheB nicht immer frei zugänglich ist. Damit wäre nachfolgend auch weniger an NheC gebundenes NheB durch den enzymmarkierten mAk 1E11 nachweisbar. Ein anderer Ansatz wäre die variierende Sekretionsmenge der NheC-Komponente. Wie bereits oben erwähnt, wird die geringe NheC-Produktion auf eine Schleifenbildung zwischen *nheB* und *nheC* auf mRNA-Ebene zurückgeführt, was in einer Hemmung der NheC-Translation resultiert (Granum et al., 1999; Lindbäck et al., 2004). Diese

Hemmung könnte von Stamm zu Stamm zudem unterschiedlich ausgeprägt sein, was die variierenden Ergebnisse des NheC/B-Sandwich-EIAs erklären könnte.

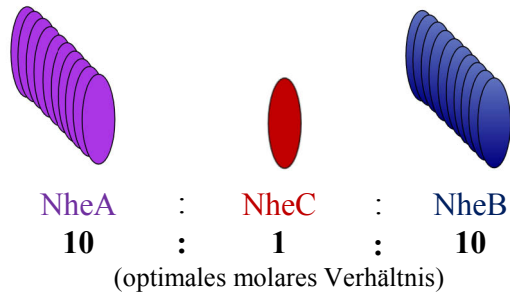
Im Rahmen der Zellbindungsstudien von Lindbäck et al. (2010) wurde bei der natürlichen *B. cereus*-Mutante MHI 1672 (produziert NheA und NheB) eine Resttoxizität von ca. 2 % im Vergleich zur Toxizität von Referenzstämmen gemessen. Diese war durch den NheB-spezifischen mAk 1E11 neutralisierbar. Interessanterweise konnten bei diesem Isolat im neu etablierten NheC/B-Sandwich-EIA geringe Mengen an NheB-NheC-Komplexen nachgewiesen werden. Dies deutet darauf hin, dass MHI 1672 trotz des Stopcodons am 5'-Ende von *nheC* kleine Mengen an NheC sezerniert (Verhältnis NheB:NheC circa 100:1; unveröffentlichtes Ergebnis). Vermutlich wird das Stopcodon vereinzelt überlesen, so dass sehr geringe Mengen an NheC exprimiert werden können. Haug et al. (2010) postulierten kürzlich, dass NheA und NheB bei Einsatz in hohen Konzentrationen alleinverantwortlich für die toxische Wirkung auf Rattenhypophysenzellen (GH₄) seien. Da für diese Analysen jedoch Kulturüberstände des Isolates MHI 1672 verwendet worden waren, könnten die von den Autoren beobachteten Effekte auch auf das mögliche Vorhandensein geringer NheC-Konzentrationen zurückzuführen sein.

Um die Bedeutung der NheB-NheC-Komplexe noch besser verstehen zu können, wurden abschließend weitere Versuche mit Verozellen durchgeführt. Ein Vergleich zwischen Komplexbildung (EIA-Analysen) und Zytotoxizität (Zellkulturtests) zeigte zum einen, dass zwischen relativer Menge an NheB-NheC-Komplexen und dem Verhältnis NheB:NheC eine direkte Korrelation besteht. Außerdem war im Bereich zwischen 50:1 (NheB:NheC) und 5:1 der maximale zytotoxische Effekt zu beobachten. Mittels Durchflusszytometrie wurde parallel die Bindung von NheB an Verozellen quantifiziert. Im oben genannten Bereich konnte interessanterweise der höchste Prozentsatz an zellgebundenem NheB nachgewiesen werden. Lag das Verhältnis von NheB:NheC unter 5:1, konnte mit dem eingesetzten Analyseverfahren sowohl weniger zellgebundenes NheB detektiert, als auch ein höheres Maß an Komplexbildung in Lösung gezeigt werden. In einer jüngeren Studie war bereits gemutmaßt worden, dass der hemmende Effekt von NheC im Überschuss auf eine übermäßige Formierung von NheB-NheC-Komplexen zurückzuführen sein könnte (Lindbäck et al., 2010). In diesen früheren Versuchen zeigte sich ein zytolytischer Effekt nur dann, wenn NheA und NheB nach einem Waschschrift hinzugefügt wurden, bei welchem überschüssiges NheC entfernt worden war. Aufgrund der neu gewonnenen Erkenntnisse lässt sich ergänzen, dass sowohl eine definierte Menge an NheB-NheC-Komplexen, als auch eine ausreichende Menge an freiem NheB nötig zu sein scheint, damit eine effiziente Zellbindung und Zytotoxizität

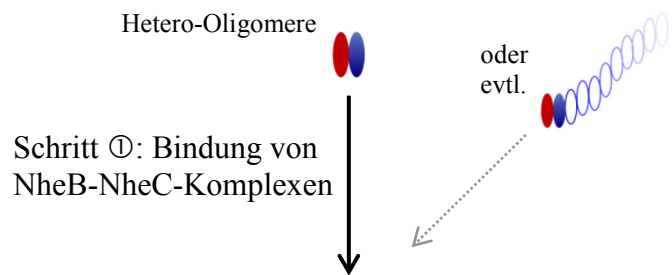
durch den Nhe-Enterotoxinkomplex gewährleistet sind.

Zusammenfassend ist unter Berücksichtigung der im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse folgendes Modell zum Wirkungsmechanismus von Nhe auf Zellen denkbar (Abbildung 2): Nachdem *B. cereus* die Einzelkomponenten des Nhe-Enterotoxinkomplexes über den Sec-Translokations-Weg (Fagerlund et al., 2010) aus der Zelle ausgeschleust hat, kommt es zur Komplexbildung zwischen NheB und NheC. Im ersten Schritt des „mode of action“ binden diese Hetero-Oligomere gemeinsam an die Zelloberfläche (Lindbäck et al., 2010). Hierbei ist anzunehmen, dass die Bindung an bestimmte Oberflächenstrukturen erfolgt, die sowohl die NheB-NheC-Komplexe, als auch freies NheC erkennen können. Ob die in früheren Studien nachgewiesene Bindung von freiem NheB an die Zielzellen (Lindbäck et al., 2010) auch an diese Strukturen erfolgt, bleibt derzeit fraglich. Des Weiteren muss noch geklärt werden, ob es sich bei diesen Strukturen um einen Rezeptor im engeren Sinne handelt. Fagerlund et al. (2008) hatten – in einem allerdings wiederum artifiziellen System – gezeigt, dass Nhe auch in synthetischen Lipiddoppelschicht-Membranen Poren bilden kann, weshalb vermutet wurde, dass die Nhe-Bindung an Zellmembranen auch ohne spezifischen Rezeptor erfolgen kann. Während der Bindung an die Zelle kommt es zu Konformationsänderungen (Phung et al., 2012b), welche die Bindung von weiterem freiem NheB gewährleisten. Eine zusätzliche Bindung von NheB-NheC-Komplexen ist indes nicht möglich. Die Bindung der oben genannten ausreichenden Mengen an freiem NheB ist vermutlich notwendig, um über eine Art Kettenverlängerung zu einer ringförmigen Struktur (Präpore) zu führen. In einem letzten Schritt bindet dann NheA an das zellgebundene NheB, und es kommt zur transmembranären Porenbildung (Didier et al., 2012).

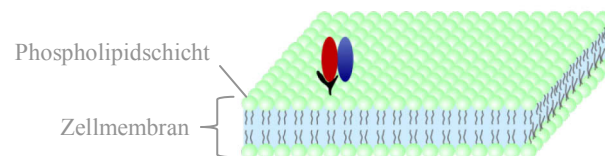
**A Sekretion/ Diffusion
in Lösung**



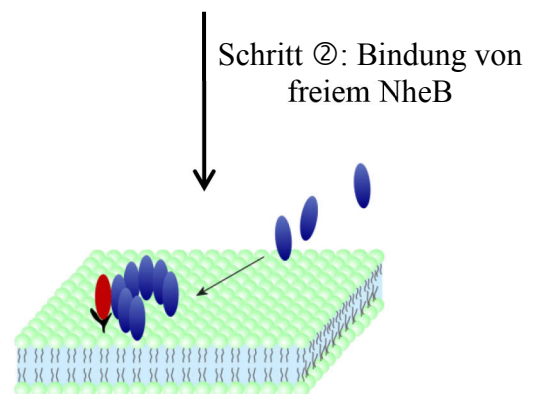
**B Komplexbildung von
NheB und NheC
in Lösung**



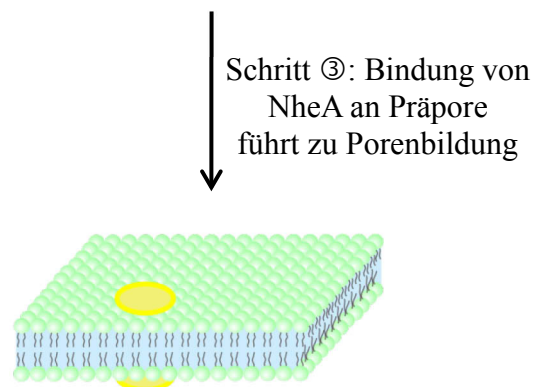
**C Assoziation an die
Zielzelle und
Konformations-
änderung**



**D Kettenverlängerung
von NheB zu ring-
förmiger Struktur
(Präpore)**



**E Transmembranäre
Porenbildung**



➔ Zytotoxische Effekte

Abbildung 2. Schematische Darstellung des Nhe-Wirkmechanismus („mode of action“).

Im Rahmen dieser Arbeit ist es gelungen, eine effektive Methode zur Herstellung von aufgereinigtem rekombinanten NheC zu etablieren. Neu generierte NheC-spezifische monoklonale Antikörper ermöglichten erstmals die direkte Darstellung der Bindung von NheC an seine Zielzellen. Durch die Etablierung eines neuartigen NheC/B-Sandwich-EIAs basierend auf einer Kombination von NheC- und NheB-spezifischen mAk wurde ein Verfahren erstellt, mit dem es nun auch möglich ist, NheB-NheC-Komplexe in natürlichen Überständen von *B. cereus*-Stämmen nachzuweisen. Das Interesse weiterführender Studien wird unter anderem in der Aufklärung von strukturellen und biochemischen Eigenschaften dieser Komplexbildung liegen. Außerdem können die neu generierten monoklonalen Antikörper in weiteren Studien verwendet werden, um einen möglichen Zellrezeptor zu finden.

V ZUSAMMENFASSUNG

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Entwicklung und Charakterisierung monoklonaler Antikörper (mAk) gegen die C-Komponente des Non-haemolytic Enterotoxin (Nhe)-Komplexes von *Bacillus cereus* sowie deren Einsatz zur Analyse der Rolle des NheC im Hinblick auf die Wirkungsweise von Nhe.

NheC wurde in *Escherichia coli* rekombinant exprimiert und mittels Immunaффinitätschromatographie aufgereinigt. Nach Überprüfung durch SDS-PAGE und Quantifizierung mittels SYPRO[®] Ruby Protein Gel Färbung wurde das gereinigte Toxin als Immunogen eingesetzt. Nachfolgend konnten drei mAk vom IgG-Subtyp (mAk 2G8, 1E12, 2F10) und ein mAk vom IgM-Subtyp (mAk 3D6) gegen NheC hergestellt werden. Die Charakterisierung der mAk erfolgte mittels Enzymimmuntest (EIA), Western Immunblot und Immunfluoreszenzmikroskopie. Bei Verwendung eines indirekten EIAs erlaubten die mAk den sensitiven Nachweis von rNheC im unteren Nanogrammbereich (Nachweisgrenze 10 – 15 ng/ml). Untersuchungen zur Spezifität der mAk innerhalb des Nhe-Komplexes mittels indirekten EIAs und Western Immunblots zeigten, dass die mAk 2G8 und 1E12 substantielle Kreuzreaktionen mit der strukturverwandten NheB-Komponente aufweisen. Dies konnte durch Epitopanalysen und kompetitive Bindungstests noch bestätigt werden. Während die mAk 2G8, 1E12 und 3D6 mit allen überprüften *B. cereus*-Stämmen reagierten, weist das von dem mAk 2F10 erkannte Epitop eine stammspezifische Variabilität auf. In Zellkulturtests war keiner der vier mAk in der Lage die zytotoxische Aktivität des Nhe-Komplexes zu neutralisieren. Demgegenüber gelang es mit allen mAk mittels Immunfluoreszenz erstmals die direkte Bindung von NheC an die Zielzelle darzustellen.

Unter Verwendung eines polyklonalen Kaninchen-Antiserums gegen NheC als Fangantikörper und der vier mAk gegen NheC als Nachweisantikörper wurden hochempfindliche Sandwich-EIAs für den Nachweis von gereinigtem NheC entwickelt. In natürlichen *B. cereus*-Überständen konnten jedoch nur geringe Mengen (< 10 %) des theoretisch vorhandenen NheC nachgewiesen werden. Die auf diesen Ergebnissen basierende Hypothese, dass NheC in Lösung an NheB gebunden vorliegt, konnte zunächst in artifiziellen Systemen bestätigt werden. Mangels SDS-Stabilität der NheB-NheC-Komplexe, erfolgte der Nachweis mittels intermolekularem Cross-Linking und Dot Blot-Analysen. Durch Kombination des NheC-spezifischen mAk 3D6 als Fangantikörper und des HRP-gekoppelten

mAk 1E11 gegen NheB als Nachweisantikörper konnte ein spezifischer NheC/B-Sandwich-EIA zum Nachweis von NheB-NheC-Komplexen in *B. cereus*-Kulturüberständen etabliert werden.

Zur Analyse der Funktion der NheB-NheC-Komplexe wurde zum einen die Komplexbildung mit der Zytotoxizität verglichen, und zum anderen per Durchflusszytometrie deren Zellbindung mittels NheB-Quantifizierung (durch mAk 1E11) bestimmt. Fazit ist, dass scheinbar sowohl eine definierte Menge an NheB-NheC-Komplexen, als auch ausreichend freies NheB vorhanden sein müssen, damit effiziente Zellbindung und Zytotoxizität von Nhe gewährleistet sind.

VI SUMMARY

Mode of action of the *Bacillus cereus* enterotoxin Nhe: Relevance of Complex Formation between NheB and NheC

This study describes the development and characterization of monoclonal antibodies (mAbs) against the C-component of the nonhemolytic enterotoxin (Nhe) complex produced by *B. cereus*, and their usage for analyzing the role of NheC within the Nhe-“mode of action”.

NheC was recombinantly expressed in *Escherichia coli* and purified by immunoaffinity chromatography. After examination by SDS-PAGE and quantification by SYPRO[®] Ruby protein gel stain, the purified toxin was used as immunogen. Subsequently three mAbs (mAbs 2G8, 1E12, 2F10) of the IgG subtype and one mAb (mAb 3D6) of the IgM subtype were produced against NheC. The mAbs were characterized by means of enzyme immunoassay (EIA), Western immunoblot and immunofluorescence microscopy. Using an indirect EIA all mAbs were able to detect rNheC sensitively in the low nanogram range (detection limit 10 – 15 ng/ml). Specificity analyses of the mAbs within the Nhe complex revealed substantial crossreactivity of the mAbs 2G8 and 1E12 with the structurally related NheB-component. This finding was further confirmed by epitope-mapping and competitive binding assays. Whereas the mAbs 2G8, 1E12 and 3D6 reacted with all of the tested *B. cereus* strains, the epitope recognized by the mAb 2F10 shows strain specific variability. In cell culture assays none of the four mAbs was capable to neutralize the cytotoxic activity of the Nhe-complex. On the other hand, all mAbs reacted with cell-bound NheC thus for the first time directly demonstrating the interaction of NheC with membranes of the target cells.

Using the polyclonal rabbit antiserum against NheC as capture antibody and the four mAbs against NheC as detection antibodies, a highly sensitive sandwich-EIA for the detection of purified NheC was developed. However applying natural supernatants of *B. cereus*, less than 10 % of the expected NheC values could be detected. The outcome of these experiments led to the hypothesis that NheC in solution is bound to NheB. Due to the SDS-instability of the NheB-NheC complexes cross-linking experiments and dot blot analyses were used to confirm this hypothesis. Finally, by combining the NheC-specific mAb 3D6 as capture antibody and the HRP-labeled mAb 1E11 against NheB as detection antibody a specific NheC/B-sandwich EIA for the detection of NheB-NheC complexes in *B. cereus* culture supernatants was established.

In order to analyze the function of the NheB-NheC complexes, complex formation was compared with cytotoxicity and cell binding of the complexes was analyzed by flow cytometry using a NheB-specific mAb (mAb 1E11). In conclusion, both a defined level of NheB-NheC complexes and sufficient amount of free NheB seem to be necessary for efficient cell binding and toxicity of Nhe.

VII LITERATURVERZEICHNIS

AGAISSE, H., M. GOMINET, O. A. OKSTAD, A. B. KOLSTO & D. LERECLUS (1999):

PlcR is a pleiotropic regulator of extracellular virulence factor gene expression in *Bacillus thuringiensis*.

Mol. Microbiol. 32, 1043-1053.

AGATA, N., M. MORI, M. OHTA, S. SUWAN, I. OHTANI & M. ISOBE (1994):

A novel dodecadepsipeptide, cereulide, isolated from *Bacillus cereus* causes vacuole formation in HEp-2 cells.

FEMS Microbiol. Lett. 121, 31-34.

AGATA, N., M. OHTA, Y. ARAKAWA & M. MORI (1995a):

The *bceT* gene of *Bacillus cereus* encodes an enterotoxigenic protein.

Microbiology. 141, 983-988.

AGATA, N., M. OHTA, M. MORI & M. ISOBE (1995b):

A novel dodecadepsipeptide, cereulide, is an emetic toxin of *Bacillus cereus*.

FEMS Microbiol. Lett. 129, 17-20.

ANDERSSON, A., P. E. GRANUM & U. RÖNNER (1998):

The adhesion of *Bacillus cereus* spores to epithelial cells might be an additional virulence mechanism.

Int. J. Food Microbiol. 39, 93-99.

ANKOLEKAR, C., T. RAHMATI & R. G. LABBE (2009):

Detection of toxigenic *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* spores in U.S. rice.

Int. J. Food Microbiol. 128, 460-466.

ARAGON-ALEGRO, L. C., G. PALCICH, G. V. LOPES, V. B. RIBEIRO, M. LANDGRAF & M. T. DESTRO (2008):

Enterotoxigenic and genetic profiles of *Bacillus cereus* strains of food origin in Brazil.

J. Food Prot. 71, 2115-2118.

ASANO, S. I., Y. NUKUMIZU, H. BANDO, T. IIZUKA & T. YAMAMOTO (1997):

Cloning of novel enterotoxin genes from *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis*.

Appl. Environ. Microbiol. 63, 1054-1057.

AUGER, S., N. GALLERON, E. BIDNENKO, S. D. EHRLICH, A. LAPIDUS & A. SOROKIN (2008):

The genetically remote pathogenic strain NVH391-98 of the *Bacillus cereus* group is representative of a cluster of thermophilic strains.

Appl. Environ. Microbiol. 74, 1276-1280.

AUGER, S., N. GALLERON, B. SEGURENS, C. DOSSAT, A. BOLOTIN, P. WINCKER & A. SOROKIN (2012):

Complete genome sequence of the highly hemolytic strain *Bacillus cereus* F837/76.

J. Bacteriol. 194, 1630.

BAIDA, G., Z. I. BUDARINA, N. P. KUZMIN & A. S. SOLONIN (1999):

Complete nucleotide sequence and molecular characterization of hemolysin II gene from *Bacillus cereus*.

FEMS Microbiol. Lett. 180, 7-14.

BAIDA, G. E. & N. P. KUZMIN (1995):

Cloning and primary structure of a new hemolysin gene from *Bacillus cereus*.

Biochim. Biophys. Acta. 1264, 151-154.

BANEYX, F. (1999):

Recombinant protein expression in *Escherichia coli*.

Curr. Opin. Biotechnol. 10, 411-221.

BEATTIE, S. H. & A. G. WILLIAMS (2002):

Growth and diarrhoeagenic enterotoxin formation by strains of *Bacillus cereus* in vitro in controlled fermentations and in situ in food products and a model food system.

Food Microbiol. 19, 329-340.

BECKER, B., H. BECKER, C. BÜRK, R. DIETRICH & E. MÄRTLBAUER (2005):

Pathogene Mikroorganismen - *Bacillus cereus*.

Behr Verlag, Hamburg.

BEECHER, D. J. & J. D. MACMILLAN (1990):

A novel bicomponent hemolysin from *Bacillus cereus*.

Infect. Immun. 58, 2220-2227.

BEECHER, D. J. & J. D. MACMILLAN (1991):

Characterization of the components of Hemolysin BL from *Bacillus cereus*.

Infect. Immun. 59, 1778-1784.

BEECHER, D. J., T. W. OLSEN, E. B. SOMERS & A. C. L. WONG (2000):

Evidence for contribution of tripartite hemolysin BL, phosphatidylcholine-preferring phospholipase C, and collagenase to virulence of *Bacillus cereus* endophthalmitis.

Infect. Immun. 68, 5269-5276.

BEECHER, D. J., J. L. SCHOENI & A. C. L. WONG (1995):

Enterotoxic activity of hemolysin BL from *Bacillus cereus*.

Infect. Immun. 63, 4423-4428.

BEECHER, D. J. & A. C. WONG (1994a):

Identification and analysis of the antigens detected by two commercial *Bacillus cereus* diarrheal enterotoxin immunoassay kits.

Appl. Environ. Microbiol. 60, 4614-4616.

BEECHER, D. J. & A. C. WONG (1997):

Tripartite hemolysin BL from *Bacillus cereus*. Hemolytic analysis of component interactions and a model for its characteristic paradoxical zone phenomenon.

J. Biol. Chem. 272, 233-239.

BEECHER, D. J. & A. C. WONG (2000a):

Cooperative, synergistic and antagonistic haemolytic interactions between haemolysin BL, phosphatidylcholine phospholipase C and sphingomyelinase from *Bacillus cereus*.

Microbiology. 146 Pt 12, 3033-3039.

BEECHER, D. J. & A. C. WONG (2000b):

Tripartite haemolysin BL: isolation and characterization of two distinct homologous sets of components from a single *Bacillus cereus* isolate.

Microbiology. 146 (Pt 6), 1371-1380.

BEECHER, D. J. & A. C. L. WONG (1994b):

Improved purification and characterization of hemolysin BL, a hemolytic dermonecrotic vascular permeability factor from *Bacillus cereus*.

Infect. Immun. 62, 980-986.

BERGDOLL, M. S. (1988):

Ileal loop fluid accumulation test for diarrheal toxins.

Methods Enzymol. 165, 306-323.

BOTTONE, E. J. (2010):

Bacillus cereus, a volatile human pathogen.

Clin. Microbiol. Rev. 23, 382-398.

BOWDEN, G. A. & G. GEORGIOU (1990):

Folding and aggregation of beta-lactamase in the periplasmic space of *Escherichia coli*.

J. Biol. Chem. 265, 16760-16766.

BROWN, R. W. & R. K. SCHERER (1957):

A report on two cases of acute mastitis caused by *Bacillus cereus*.

Cornell Vet. 47, 226-240.

BRYAN, F. L. (1981):

Hazard analysis critical control point approach: epidemiologic rationale and application to foodservice operations.

J. Environ. Health. 44, 7-14.

BUCHANAN, R. L. & F. J. SCHULTZ (1994):

Comparison of the Tecra VIA kit, Oxoid BCET-RPLA kit and CHO cell culture assay for the detection of *Bacillus cereus* diarrhoeal enterotoxin.

Lett. Appl. Microbiol. 19, 353-356.

CABIAUX, V., C. WOLFF & J. M. RUYSSCHAERT (1997):

Interaction with a lipid membrane: a key step in bacterial toxins virulence.

Int. J. Biol. Macromol. 21, 285-298.

CADOT, C., S. L. TRAN, M. L. VIGNAUD, M. L. DE BUYSER, A. B. KOLSTO, A. BRISABOIS, C. NGUYEN-THÉ, D. LERECLUS, M. H. GUINEBRETIÈRE & N. RAMARAO (2010):

InhA1, NprA, and HlyII as Candidates for Markers To Differentiate Pathogenic from Nonpathogenic *Bacillus cereus* Strains.

J. Clin. Microbiol. 48, 1358-1365.

CALLEGAN, M. C., M. S. GILMORE, M. GREGORY, R. T. RAMADAN, B. J. WISKUR, A. L. MOYER, J. J. HUNT & B. D. NOVOSAD (2007):

Bacterial endophthalmitis: Therapeutic challenges and host-pathogen interactions.

Prog. Retin. Eye Res. 26, 189-203.

CALLEGAN, M. C., S. GUESS, N. R. WHEATLEY, D. C. WOODS, G. GRIFFIN, B. J. WISKUR & R. LEONARD (2011):

Efficacy of vitrectomy in improving the outcome of *Bacillus cereus* endophthalmitis.

Retina. 31, 1518-1524.

CASTEDO, E., A. CASTRO, P. MARTIN, J. RODA & C. G. MONTERO (1999):

Bacillus cereus prosthetic valve endocarditis.

Ann. Thorac. Surg. 68, 2351-2352.

CEUPPENS, S., A. RAJKOVIC, M. HEYNDRIKX, V. TSILIA, T. VAN DE WIELE, N. BOON & M. UYTENDAELE (2011):

Regulation of toxin production by *Bacillus cereus* and its food safety implications.

Crit. Rev. Microbiol. 37, 188-213.

CLAIR, G., S. ROUSSI, J. ARMENGAUD & C. DUPORT (2010):

Expanding the known repertoire of virulence factors produced by *Bacillus cereus* through early secretome profiling in three redox conditions.

Mol. Cell. Proteomics. 9, 1486-1498.

CLAVEL, T., F. CARLIN, D. LAIRON, C. NGUYEN-THE & P. SCHMITT (2004):

Survival of *Bacillus cereus* spores and vegetative cells in acid media simulating human stomach.

J. Appl. Microbiol. 97, 214-219.

COHN, F. (1876):

Untersuchungen über Bakterien. IV. Beiträge zur Biologie der Bacillen.

Beiträge zur Biologie der Pflanzen. 2, 249-276.

DANCER, S. J., D. MCNAIR, P. FINN & A. B. KOLSTO (2002):

Bacillus cereus cellulitis from contaminated heroin.

J. Med. Microbiol. 51, 278-281.

DAS, T., K. CHOUDHURY, S. SHARMA, S. JALALI & R. NUTHETHI (2001):

Clinical profile and outcome in *Bacillus* endophthalmitis.

Ophthalmology. 108, 1819-1825.

DAVEY, R. T., JR. & W. B. TAUBER (1987):

Posttraumatic endophthalmitis: the emerging role of *Bacillus cereus* infection.

Rev. Infect. Dis. 9, 110-123.

DE JONGHE, V., A. COOREVITS, J. DE BLOCK, E. VAN COILLIE, K. GRIJSPEERDT, L. HERMAN, P. DE VOS & M. HEYNDRICKX (2010):

Toxinogenic and spoilage potential of aerobic spore-formers isolated from raw milk.

Int. J. Food Microbiol. 136, 318-325.

DE KEYZER, J., C. VAN DER DOES & A. J. DRIESSEN (2003):

The bacterial translocase: a dynamic protein channel complex.

Cell. Mol. Life Sci. 60, 2034-2052.

DECLERCK, N., L. BOUILLAUT, D. CHAIX, N. RUGANI, L. SLAMTI, F. HOH, D. LERECLUS & S. T. AROLD (2007):

Structure of PlcR: Insights into virulence regulation and evolution of quorum sensing in Gram-positive bacteria.

Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 104, 18490-18495.

DIDIER, A., R. DIETRICH, S. GRUBER, S. BOCK, M. MORAVEK, T. NAKAMURA, T. LINDBÄCK, P. E. GRANUM & E. MÄRTLBAUER (2012):

Monoclonal antibodies neutralize *Bacillus cereus* Nhe enterotoxin by inhibiting ordered binding of its three exoprotein components.

Infect. Immun. 80, 832-838.

DIERICK, K., E. VAN COILLIE, I. SWIECICKA, G. MEYFROIDT, H. DEVLIEGER, A. MEULEMANS, G. HOEDEMAEKERS, L. FOURIE, M. HEYNDRICKX & J. MAHILLON (2005):

Fatal family outbreak of *Bacillus cereus*-associated food poisoning.

J. Clin. Microbiol. 43, 4277-4279.

DIETRICH, R., C. FELLA, S. STRICH & E. MÄRTLBAUER (1999):

Production and characterization of monoclonal antibodies against the hemolysin BL enterotoxin complex produced by *Bacillus cereus*.

Appl. Environ. Microbiol. 65, 4470-4474.

DIETRICH, R., K. MAUERSBERGER & E. MÄRTLBAUER (1997):

Use of the MTT test for the detection of *B. cereus* enterotoxin.

Archiv Für Lebensmittelhygiene. 48, 77-81.

DIETRICH, R., M. MORAVEK, C. BÜRK, P. E. GRANUM & E. MÄRTLBAUER (2005):

Production and characterization of antibodies against each of the three subunits of the *Bacillus cereus* nonhemolytic enterotoxin complex.

Appl. Environ. Microbiol. 71, 8214-8220.

DROBNIEWSKI, F. A. (1993):

Bacillus cereus and related species.

Clin. Microbiol. Rev. 6, 324-338.

DUBOUIX, A., E. BONNET, M. ALVAREZ, H. BENSAFI, M. ARCHAMBAUD, B. CHAMINADE, G. CHABANON & N. MARTY (2005):

Bacillus cereus infections in Traumatology-Orthopaedics Department: retrospective investigation and improvement of healthcare practices.

J. Infect. 50, 22-30.

DUC LE, H., H. A. HONG, T. M. BARBOSA, A. O. HENRIQUES & S. M. CUTTING (2004):

Characterization of *Bacillus* probiotics available for human use.

Appl. Environ. Microbiol. 70, 2161-2171.

DUPORT, C., S. THOMASSIN, G. BOUREL & P. SCHMITT (2004):

Anaerobiosis and low specific growth rates enhance hemolysin BL production by *Bacillus cereus* F4430/73.

Arch. Microbiol. 182, 90-95.

DUPORT, C., A. ZIGHA, E. ROSENFELD & P. SCHMITT (2006):

Control of enterotoxin gene expression in *Bacillus cereus* F4430/73 involves the redox-sensitive ResDE signal transduction system.

J. Bacteriol. 188, 6640-6651.

EFSA (2009):

The Community Summary Report on Food-Borne Outbreaks in The European Union in 2007.

EFSA Journal. 271.

EHLING-SCHULZ, M., M. FRICKER, H. GRALLERT, P. RIECK, M. WAGNER & S. SCHERER. (2006a):

Cereulide synthetase gene cluster from emetic *Bacillus cereus*: structure and location on a mega virulence plasmid related to *Bacillus anthracis* toxin plasmid pXO1.

BMC Microbiol. [Online], 6. Available: <http://www.biomedcentral.com/1471-2180/6/20>.

EHLING-SCHULZ, M., M. FRICKER & S. SCHERER (2004):

Bacillus cereus, the causative agent of an emetic type of food-borne illness.

Mol. Nutr. Food Res. 48, 479-487.

EHLING-SCHULZ, M., M. H. GUINEBRETIERE, A. MONTHAN, O. BERGE, M. FRICKER & B. SVENSSON (2006b):

Toxin gene profiling of enterotoxic and emetic *Bacillus cereus*.

FEMS Microbiol. Lett. 260, 232-240.

EHLING-SCHULZ, M., N. VUKOV, A. SCHULZ, R. SHAHEEN, M. ANDERSSON, E. MÄRTLBAUER & S. SCHERER (2005):

Identification and partial characterization of the nonribosomal peptide synthetase gene responsible for cereulide production in emetic *Bacillus cereus*.

Appl. Environ. Microbiol. 71, 105-113.

ESBELIN, J., J. ARMENGAUD, A. ZIGHA & C. DUPORT (2009):

ResDE-dependent regulation of enterotoxin gene expression in *Bacillus cereus*: evidence for multiple modes of binding for ResD and interaction with Fnr.

J. Bacteriol. 191, 4419-4426.

ESBELIN, J., Y. JOUANNEAU, J. ARMENGAUD & C. DUPORT (2008):

ApoFnr binds as a monomer to promoters regulating the expression of enterotoxin genes of *Bacillus cereus*.

J. Bacteriol. 190, 4242-4251.

EWALD, C., A. HEER, L. HEIKING & G. MOLL (1985):

Mastitiden durch *Bacillus cereus* bei medikamentell trockengestellten Milchkühen.

Prakt. Tierarzt. 66, 1025-1028.

FAGERLUND, A., J. BRILLARD, R. FÜRST, M. H. GUINEBRETIERE & P. E. GRANUM (2007):

Toxin production in a rare and genetically remote cluster of strains of the *Bacillus cereus* group.

BMC Microbiol. 7, 43.

FAGERLUND, A., T. LINDBÄCK & P. E. GRANUM (2010):

Bacillus cereus cytotoxins Hbl, Nhe and CytK are secreted via the Sec translocation pathway.

BMC Microbiol. 10, 304.

FAGERLUND, A., T. LINDBÄCK, A. K. STORSET, P. E. GRANUM & S. P. HARDY (2008):

Bacillus cereus Nhe is a pore-forming toxin with structural and functional properties similar to the ClyA (HlyE, SheA) family of haemolysins, able to induce osmotic lysis in epithelia.

Microbiology. 154, 693-704.

FAGERLUND, A., O. WEEN, T. LUND, S. P. HARDY & P. E. GRANUM (2004):

Genetic and functional analysis of the cytK family of genes in *Bacillus cereus*.

Microbiology. 150, 2689-2697.

FAILLE, C., J. M. MEMBRE, M. KUBACZKA & F. GAVINI (2002):

Altered ability of *Bacillus cereus* spores to grow under unfavorable conditions (presence of nisin, low temperature, acidic pH, presence of NaCl) following heat treatment during sporulation.

J. Food Prot. 65, 1930-1936.

FAILLE, C., G. TAUVERON, C. LE GENTIL-LELIEVRE & C. SLOMIANNY (2007):

Occurrence of *Bacillus cereus* spores with a damaged exosporium: consequences on the spore adhesion on surfaces of food processing lines.

J. Food Prot. 70, 2346-2353.

FERMANIAN, C., C. LAPEYRE, J. M. FREMY & M. CLAISSE (1997):

Diarrhoeal toxin production at low temperature by selected strains of *Bacillus cereus*.

J. Dairy Res. 64, 551-559.

FRANKARD, J., R. LI, F. TACCONE, M. J. STRUELENS, F. JACOBS & A. KENTOS (2004):

Bacillus cereus pneumonia in a patient with acute lymphoblastic leukemia.

Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 23, 725-728.

FRANKLAND, G. C. & P. F. FRANKLAND (1887):

Studies in some new micro-organisms obtained from air.

Philos. Trans. R. Soc. London, B. 178, 257-287.

GARCIA-ARRIBAS, M. L. & J. M. KRAMER (1990):

The effect of glucose, starch, and pH on growth, enterotoxin and haemolysin production by strains of *Bacillus cereus* associated with food poisoning and non-gastrointestinal infection.

Int. J. Food Microbiol. 11, 21-33.

GAUR, A. H., C. C. PATRICK, J. A. MCCULLERS, P. M. FLYNN, T. A. PEARSON, B. I. RAZZOUK, S. J. THOMPSON & J. L. SHENEP (2001):

Bacillus cereus bacteremia and meningitis in immunocompromised children.

Clin. Infect. Dis. 32, 1456-1462.

GEDEK, W. (1986):

Bacillus cereus-Mastitiden beim Rind als Folge einer Arzneimittelkontamination. 1. Merkmale der Isolate.

Tierarztl. Umsch. 41, 526-530.

GIBSON, T. & R. E. GORDON (1974):

Bacillus.

In: BUCHANAN, R. E. & N. E. GIBBONS (eds.) Bergey's manual of determinative bacteriology. 8th ed.

Williams & Wilkins, Baltimore.

GINSBURG, A. S., L. G. SALAZAR, L. D. TRUE & M. L. DISIS (2003):

Fatal *Bacillus cereus* sepsis following resolving neutropenic enterocolitis during the treatment of acute leukemia.

Am. J. Hematol. 72, 204-208.

GLATZ, B. A., W. M. SPIRA & J. M. GOEPFERT (1974):

Alteration of vascular permeability in rabbits by culture filtrates of *Bacillus cereus* and related species.

Infect. Immun. 10, 299-303.

GOHAR, M., K. FAEGRI, S. PERCHAT, S. RAVNUM, O. A. OKSTAD, M. GOMINET, A. B. KOLSTO & D. LERECLUS (2008):

The PlcR virulence regulon of *Bacillus cereus*.

PLoS One. 3, e2793.

GOHAR, M., O. A. OKSTAD, N. GILOIS, V. SANCHIS, A. B. KOLSTO & D. LERECLUS (2002):

Two-dimensional electrophoresis analysis of the extracellular proteome of *Bacillus cereus* reveals the importance of the PlcR regulon.

Proteomics. 2, 784-791.

GRANUM, P. E. (2007):

Bacillus cereus. pp. 445-455

In: DOYLE, M. P. & L. R. BEUCHAT (eds.) Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers, 3rd Ed.

ASM Press, Washington, D.C.

GRANUM, P. E., S. BRYNESTAD & J. M. KRAMER (1993):

Analysis of enterotoxin production by *Bacillus cereus* from dairy products, food poisoning incidents and non-gastrointestinal infections.

Int. J. Food Microbiol. 17, 269-279.

GRANUM, P. E., K. O'SULLIVAN & T. LUND (1999):

The sequence of the non-haemolytic enterotoxin operon from *Bacillus cereus*.

FEMS Microbiol. Lett. 177, 225-229.

GRAY, K. M., P. P. BANADA, E. O'NEAL & A. K. BHUNIA (2005):

Rapid Ped-2E9 cell-based cytotoxicity analysis and genotyping of *Bacillus* species.

J. Clin. Microbiol. 43, 5865-5872.

GRUBER, S. (2009):

Herstellung und Charakterisierung rekombinanter Einzelkomponenten des Nhe-Enterotoxinkomplexes von *Bacillus cereus*.

Diss. med. vet., Ludwig-Maximilians-Universität München.

GUINEBRETIÈRE, M. H., S. AUGER, N. GALLERON, M. CONTZEN, B. DE SARRAU, M. L. DE BUYSER, G. LAMBERET, A. FAGERLUND, P. E. GRANUM, D. LERECLUS, P. DE VOS, C. NGUYEN-THE & A. SOROKIN (2013):

Bacillus cytotoxicus sp. nov. is a novel thermotolerant species of the *Bacillus cereus* Group occasionally associated with food poisoning.

Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 63, 31-40.

GUINEBRETIÈRE, M. H., V. BROUSSOLLE & C. NGUYEN-THE (2002):

Enterotoxigenic profiles of food-poisoning and food-borne *Bacillus cereus* strains.

J. Clin. Microbiol. 40, 3053-3056.

GUINEBRETIÈRE, M. H., A. FAGERLUND, P. E. GRANUM & C. NGUYEN-THE (2006):

Rapid discrimination of *cytK-1* and *cytK-2* genes in *Bacillus cereus* strains by a novel duplex PCR system.

FEMS Microbiol. Lett. 259, 74-80.

HANSEN, B. M. & N. B. HENDRIKSEN (2001):

Detection of enterotoxigenic *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* strains by PCR analysis.

Appl. Environ. Microbiol. 67, 185-189.

HARDY, S. P., T. LUND & P. E. GRANUM (2001):

CytK toxin of *Bacillus cereus* forms pores in planar lipid bilayers and is cytotoxic to intestinal epithelia.

FEMS Microbiol. Lett. 197, 47-51.

HAUG, T. M., S. L. SAND, O. SAND, D. PHUNG, P. E. GRANUM & S. P. HARDY (2010):

Formation of very large conductance channels by *Bacillus cereus* Nhe in Vero and GH(4) cells identifies NheA + B as the inherent pore-forming structure.

J. Membr. Biol. 237, 1-11.

HAUGE, S. (1950):

B. cereus as a cause of food poisoning.

Nordisk Hyg Tidskr 31, 189-206.

HAUGE, S. (1955):

Food poisoning caused by aerobic spore-forming bacilli.

J. Appl. Microbiol. 18, 591-595.

HEINRICHS, J. H., D. J. BEECHER, J. D. MACMILLAN & B. A. ZILINSKAS (1993):

Molecular cloning and characterization of the *hblA* gene encoding the B component of hemolysin BL from *Bacillus cereus*.

J. Bacteriol. 175, 6760-6766.

HERNAIZ, C., A. PICARDO, J. I. ALOS & J. L. GOMEZ-GARCES (2003):

Nosocomial bacteremia and catheter infection by *Bacillus cereus* in an immunocompetent patient.

Clin. Microbiol. Infect. 9, 973-975.

HILLIARD, N. J., R. L. SCHELONKA & K. B. WAITES (2003):

Bacillus cereus bacteremia in a preterm neonate.

J. Clin. Microbiol. 41, 3441-3444.

HOFFMASTER, A. R., K. K. HILL, J. E. GEE, C. K. MARSTON, B. K. DE, T. POPOVIC, D. SUE, P. P. WILKINS, S. B. AVASHIA, R. DRUMGOOLE, C. H. HELMA, L. O. TICKNOR, R. T. OKINAKA & P. J. JACKSON (2006):

Characterization of *Bacillus cereus* isolates associated with fatal pneumonias: Strains are closely related to *Bacillus anthracis* and Harbor *B. anthracis* virulence genes.

J. Clin. Microbiol. 44, 3352-3360.

HONG, H. A., H. DUC LE & S. M. CUTTING (2005):

The use of bacterial spore formers as probiotics.

FEMS Microbiol. Rev. 29, 813-835.

HORWOOD, P. F., G. W. BURGESS & H. J. OAKEY (2004):

Evidence for non-ribosomal peptide synthetase production of cereulide (the emetic toxin) in *Bacillus cereus*.

FEMS Microbiol. Lett. 236, 319-324.

IN'T VELD, P. H., W. S. RITMEESTER, E. H. DELFGOU-VAN ASCH, J. B. DUFRENNE, K. WERNARS, E. SMIT & F. M. VAN LEUSDEN (2001):

Detection of genes encoding for enterotoxins and determination of the production of enterotoxins by HBL blood plates and immunoassays of psychrotrophic strains of *Bacillus cereus* isolated from pasteurised milk.

Int. J. Food Microbiol. 64, 63-70.

JACKSON, S. G. (1993):

Rapid screening test for enterotoxin-producing *Bacillus cereus*.

J. Clin. Microbiol. 31, 972-974.

KATSUYA, H., T. TAKATA, T. ISHIKAWA, H. SASAKI, K. ISHITSUKA, Y. TAKAMATSU & K. TAMURA (2009):

A patient with acute myeloid leukemia who developed fatal pneumonia caused by carbapenem-resistant *Bacillus cereus*.

J. Infect. Chemother. 15, 39-41.

KIRKBRIDE, C. A., J. E. COLLINS & C. E. GATES (1986):

Porcine abortion caused by *Bacillus* sp.

J. Am. Vet. Med. Assoc. 188, 1060-1061.

KLEER, J., A. BARTHOLOMÄ, R. LEVETZOW, T. REICHE, H.-J. SINELL & P. TEUFEL (2001):

Bakterielle Lebensmittel-Infektionen und -Intoxikationen in Einrichtungen zur Gemeinschaftsverpflegung 1985-2000.

Arch. Lebensmittelhyg. 52, 76-79.

KOCH, R. (1876):

Untersuchungen über Bakterien. V. Die Aetiologie der Milzbrand Krankheit, begründet auf Entwicklungsgeschichte des *Bacillus anthracis*.

Beiträge zur Biologie der Pflanzen. 2, 277-308.

KOTIRANTA, A., K. LOUNATMAA & M. HAAPASALO (2000):

Epidemiology and pathogenesis of *Bacillus cereus* infections.

Microb. Infect. 2, 189-198.

KRAMER, J. M. & R. J. GILBERT (1989):

Bacillus cereus and other *Bacillus* species. pp. 21-70

In: DOYLE, M. P. (ed.) Foodborne Bacterial Pathogens.

Marcel Dekker, New York.

KRAUSE, N., M. MORAVEK, R. DIETRICH, E. WEHRLE, J. SLAGHUIS & E. MÄRTLBAUER (2010):

Performance characteristics of the Duopath(R) *Cereus* Enterotoxins assay for rapid detection of enterotoxinogenic *Bacillus cereus* strains.

Int. J. Food Microbiol. 144, 322-326.

KREFT, J., H. BERGER, M. HÄRTLEIN, B. MÜLLER, G. WEIDINGER & W. GOEBEL (1983):

Cloning and expression in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* of the hemolysin (cereolysin) determinant from *Bacillus cereus*.

J. Bacteriol. 155, 681-689.

KUPPE, A., L. M. EVANS, D. A. MCMILLEN & O. H. GRIFFITH (1989):

Phosphatidylinositol-specific phospholipase C of *Bacillus cereus*: cloning, sequencing, and relationship to other phospholipases.

J. Bacteriol. 171, 6077-6083.

LADEUZE, S., N. LENTZ, L. DELBRASSINNE, X. HU & J. MAHILLON (2011):

Antifungal activity displayed by cereulide, the emetic toxin produced by *Bacillus cereus*.

Appl. Environ. Microbiol. 77, 2555-2558.

LAPIDUS, A., E. GOLTSMAN, S. AUGER, N. GALLERON, B. SEGURENS, C. DOSSAT, M. L. LAND, V. BROUSSOLLE, J. BRILLARD, M. H. GUINEBRETIERE, V. SANCHIS, C. NGUEN-THE, D. LERECLUS, P. RICHARDSON, P. WINCKER, J. WEISSENBAACH, S. D. EHRLICH & A. SOROKIN (2008):

Extending the *Bacillus cereus* group genomics to putative food-borne pathogens of different toxicity.

Chem.-Biol. Interact. 171, 236-249.

LECHNER, S., R. MAYR, K. P. FRANCIS, B. M. PRUSS, T. KAPLAN, E. WIESSNER-GUNKEL, G. S. STEWART & S. SCHERER (1998):

Bacillus weihenstephanensis sp. nov. is a new psychrotolerant species of the *Bacillus cereus* group.

Int. J. Syst. Bacteriol. 48 Pt 4, 1373-1382.

LEQUIN, M. H., J. R. VERMEULEN, R. M. VAN ELBURG, F. BARKHOF, R. F. KORNELISSE, R. SWARTE & P. P. GOVAERT (2005):

Bacillus cereus meningoencephalitis in preterm infants: neuroimaging characteristics.

AJNR Am. J. Neuroradiol. 26, 2137-2143.

LERECLUS, D., H. AGAISSE, M. GOMINET, S. SALAMITOU & V. SANCHIS (1996):

Identification of a *Bacillus thuringiensis* gene that positively regulates transcription of the phosphatidylinositol-specific phospholipase C gene at the onset of the stationary phase.

J. Bacteriol. 178, 2749-2756.

LERECLUS, D., H. AGAISSE, C. GRANDVALET, S. SALAMITOU & M. GOMINET (2000):

Regulation of toxin and virulence gene transcription in *Bacillus thuringiensis*.

Int. J. Med. Microbiol. 290, 295-299.

LINDBÄCK, T., A. FAGERLUND, M. S. RODLAND & P. E. GRANUM (2004):

Characterization of the *Bacillus cereus* Nhe enterotoxin.

Microbiology. 150, 3959-3967.

LINDBÄCK, T., S. P. HARDY, R. DIETRICH, M. SODRING, A. DIDIER, M. MORAVEK, A. FAGERLUND, S. BOCK, C. NIELSEN, M. CASTEEL, P. E. GRANUM & E. MÄRTLBAUER (2010):

Cytotoxicity of the *Bacillus cereus* Nhe Enterotoxin Requires Specific Binding Order of Its Three Exoprotein Components.

Infect. Immun. 78, 3813-3821.

LINDBÄCK, T., M. MOLS, C. BASSET, P. E. GRANUM, O. P. KUIPERS & A. T. KOVÁCS (2012):

CodY, a pleiotropic regulator, influences multicellular behaviour and efficient production of virulence factors in *Bacillus cereus*.

Environ. Microbiol. 14, 2233-2246.

LINDBÄCK, T., O. A. OKSTAD, A. L. RISHOVD & A. B. KOLSTO (1999):

Insertional inactivation of hblC encoding the L2 component of *Bacillus cereus* ATCC 14579 haemolysin BL strongly reduces enterotoxigenic activity, but not the haemolytic activity against human erythrocytes.

Microbiology. 145 (Pt 11), 3139-3146.

LOGAN, N. A. (2012):

Bacillus and relatives in foodborne illness.

J. Appl. Microbiol. 112, 417-429.

LUBENAU (1906):

Bacillus peptonificans als Erreger einer Gastroenteritis-Epidemie.

Zbl Bakt I Abt Orig 40, 433-437.

LÜCKING, G., M. K. DOMMEL, S. SCHERER, A. FOUET & M. EHLING-SCHULZ (2009):

Cereulide synthesis in emetic *Bacillus cereus* is controlled by the transition state regulator AbrB, but not by the virulence regulator PlcR.

Microbiology. 155, 922-931.

LUND, T., M. L. DE BUYSER & P. E. GRANUM (2000):

A new cytotoxin from *Bacillus cereus* that may cause necrotic enteritis.

Mol. Microbiol. 38, 254-261.

LUND, T. & P. E. GRANUM (1996):

Characterisation of a non-haemolytic enterotoxin complex from *Bacillus cereus* isolated after a foodborne outbreak.

FEMS Microbiol. Lett. 141, 151-156.

LUND, T. & P. E. GRANUM (1997):

Comparison of biological effect of the two different enterotoxin complexes isolated from three different strains of *Bacillus cereus*.

Microbiology. 143 (Pt 10), 3329-3336.

LUND, T. & P. E. GRANUM (1999):

The 105-kDa protein component of *Bacillus cereus* non-haemolytic enterotoxin (Nhe) is a metalloprotease with gelatinolytic and collagenolytic activity.

FEMS Microbiol. Lett. 178, 355-361.

MADEGOWDA, M., S. ESWARAMOORTHY, S. K. BURLEY & S. SWAMINATHAN (2008):

X-ray crystal structure of the B component of Hemolysin BL from *Bacillus cereus*.

Proteins. 71, 534-540.

MAGARVEY, N. A., M. EHLING-SCHULZ & C. T. WALSH (2006):

Characterization of the cereulide NRPS alpha-hydroxy acid specifying modules: activation of alpha-keto acids and chiral reduction on the assembly line.

J. Am. Chem. Soc. 128, 10698-10699.

MAHAKARNCHANAKUL, W. & L. R. BEUCHAT (1999):

Influence of temperature shifts on survival, growth, and toxin production by psychrotrophic and mesophilic strains of *Bacillus cereus* in potatoes and chicken gravy.

Int. J. Food Microbiol. 47, 179-187.

MAHLER, H., A. PASI, J. M. KRAMER, P. SCHULTE, A. C. SCOGING, W. BÄR & S. KRÄHENBÜHL (1997):

Fulminant liver failure in association with the emetic toxin of *Bacillus cereus*.

N. Engl. J. Med. 336, 1142-1148.

MEAD, P. S., L. SLUTSKER, V. DIETZ, L. F. MCCAIG, J. S. BRESEE, C. SHAPIRO, P. M. GRIFFIN & R. V. TAUXE (1999):

Food-related illness and death in the United States.

Emerg. Infect. Dis. 5, 607-625.

MELLING, J., B. J. CAPEL, P. C. TURNBULL & R. J. GILBERT (1976):

Identification of a novel enterotoxigenic activity associated with *Bacillus cereus*.

J. Clin. Pathol. 29, 938-940.

MESSAOUDI, K., T. CLAVEL, P. SCHMITT & C. DUPORT (2010):

Fnr mediates carbohydrate-dependent regulation of catabolic and enterotoxin genes in *Bacillus cereus* F4430/73.

Res. Microbiol. 161, 30-39.

MIKKOLA, R., N. E. SARIS, P. A. GRIGORIEV, M. A. ANDERSSON & M. S. SALKINOJA-SALONEN (1999):

Ionophoretic properties and mitochondrial effects of cereulide: the emetic toxin of *B. cereus*.

Eur. J. Biochem. 263, 112-117.

MORAVEK, M., R. DIETRICH, C. BÜRK, V. BROUSSOLLE, M. H. GUINEBRETIÈRE, P. E. GRANUM, C. NGUYEN-THE & E. MÄRTLBAUER (2006):

Determination of the toxic potential of *Bacillus cereus* isolates by quantitative enterotoxin analyses.

FEMS Microbiol. Lett. 257, 293-298.

MORAVEK, M., M. WEGSCHEIDER, A. SCHULZ, R. DIETRICH, C. BÜRK & E. MÄRTLBAUER (2004):

Colony immunoblot assay for the detection of hemolysin BL enterotoxin producing *Bacillus cereus*.

FEMS Microbiol. Lett. 238, 107-113.

MORTIMER, P. R. & G. MCCANN (1974):

Food-poisoning episodes associated with *Bacillus cereus* in fried rice.

Lancet. 1, 1043-1045.

MOYER, A. L., R. T. RAMADAN, J. THURMAN, A. BURROUGHS & M. C. CALLEGAN (2008):

Bacillus cereus induces permeability of an in vitro blood-retina barrier.

Infect. Immun. 76, 1358-1367.

MUELLER, M., U. GRAUSCHOPF, T. MAIER, R. GLOCKSHUBER & N. BAN (2009):

The structure of a cytolytic alpha-helical toxin pore reveals its assembly mechanism.

Nature. 459, 726-730.

NAKAMURA, L. K. (1998):

Bacillus pseudomycooides sp. nov.

Int. J. Syst. Bacteriol. 48 Pt 3, 1031-1035.

NARANJO, M., S. DENAYER, N. BOTTELDOORN, L. DELBRASSINNE, J. VEYS, J. WAEGENAERE, N. SIRTAINÉ, R. B. DRIESEN, K. R. SIPIDO, J. MAHILLON & K. DIERICK (2011):

Sudden death of a young adult associated with *Bacillus cereus* food poisoning.

J. Clin. Microbiol. 49, 4379-4381.

NGAMWONGSATIT, P., P. P. BANADA, W. PANBANGRED & A. K. BHUNIA (2008a):

WST-1-based cell cytotoxicity assay as a substitute for MTT-based assay for rapid detection of toxigenic *Bacillus* species using CHO cell line.

J. Microbiol. Methods. 73, 211-215.

NGAMWONGSATIT, P., W. BUASRI, P. PIANARIYANON, C. PULSRIKAM, M. OHBA, A. ASSAVANIG & W. PANBANGRED (2008b):

Broad distribution of enterotoxin genes (*hblCDA*, *nheABC*, *cytK*, and *entFM*) among *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus cereus* as shown by novel primers.

Int. J. Food Microbiol. 121, 352-356.

NICHOLSON, W. L., N. MUNAKATA, G. HORNECK, H. J. MELOSH & P. SETLOW (2000):

Resistance of *Bacillus* endospores to extreme terrestrial and extraterrestrial environments.

Microbiol. Mol. Biol. Rev. 64, 548-572.

NIKODÉMUSZ, I. (1965):

Die Reproduzierbarkeit der von *Bacillus cereus* verursachten Lebensmittelvergiftungen bei Katzen.

Zbl. Bakt. I. Abt. Orig. 196, 81-87.

NIKODÉMUSZ, I. (1967):

Die enteropathogene Wirkung von *Bacillus cereus* bei Hunden.

Zbl. Bakt. I. Abt. Orig. 202, 533-538.

NIKODÉMUSZ, I. & G. GONDA (1966):

Die Wirkung langfristiger Verabreichung von *B. cereus* verunreinigten Lebensmitteln bei Katzen.

Zbl. Bakt. I. Abt. Orig. 199, 64-67.

OKSTAD, O. A., M. GOMINET, B. PURNELLE, M. ROSE, D. LERECLUS & A. B. KOLSTO (1999):

Sequence analysis of three *Bacillus cereus* loci carrying PlcR-regulated genes encoding degradative enzymes and enterotoxin.

Microbiology. 145 (Pt 11), 3129-3138.

OUHIB-JACOBS, O., N. D. LINDLEY, P. SCHMITT & T. CLAVEL (2009):

Fructose and glucose mediates enterotoxin production and anaerobic metabolism of *Bacillus cereus* ATCC14579(T).

J. Appl. Microbiol. 107, 821-829.

OUOBA, L. I., L. THORSEN & A. H. VARNAM (2008):

Enterotoxins and emetic toxins production by *Bacillus cereus* and other species of *Bacillus* isolated from Soumbala and Bikalga, African alkaline fermented food condiments.

Int. J. Food Microbiol. 124, 224-230.

PAANANEN, A., R. MIKKOLA, T. SARENEVA, S. MATIKAINEN, M. HESS, M. ANDERSSON, I. JULKUNEN, M. S. SALKINOJA-SALONEN & T. TIMONEN (2002):

Inhibition of human natural killer cell activity by cereulide, an emetic toxin from *Bacillus cereus*.

Clin. Exp. Immunol. 129, 420-428.

PARKINSON, T. J., M. MERRALL & S. G. FENWICK (1999):

A case of bovine mastitis caused by *Bacillus cereus*.

N. Z. Vet. J. 47, 151-152.

PHUNG, D., M. GANASH, S. E. SEDELNIKOVA, T. LINDBÄCK, P. E. GRANUM & P. J. ARTYMIUK (2012a):

Crystallization and preliminary crystallographic analysis of the NheA component of the Nhe toxin from *Bacillus cereus*.

Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun. 68, 1073-1076.

PHUNG, D., P. E. GRANUM, R. DIETRICH, E. MÄRTLBAUER & S. P. HARDY (2012b):

Inhibition of cytotoxicity by the Nhe cytotoxin of *Bacillus cereus* through the interaction of dodecyl maltoside with the NheB component.

FEMS Microbiol. Lett. 330, 98-104.

PINNA, A., L. A. SECHI, S. ZANETTI, D. USAI, G. DELOGU, P. CAPPUCCINELLI & F. CARTA (2001):

Bacillus cereus keratitis associated with contact lens wear.

Ophthalmology. 108, 1830-1834.

PORATH, J., J. CARLSSON, I. OLSSON & G. BELFRAGE (1975):

Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation.

Nature. 258, 598-599.

PUBLIC HEALTH LABORATORY SERVICE, P. (1972):

Food Poisoning associated with *B. cereus*.

Br. Med. J. 1, 189.

PUBLIC HEALTH LABORATORY SERVICE, P. (1973):

Bacillus cereus food poisoning.

Br. Med. J. 3, 647.

RAJKOVIC, A., M. UYTENDAELE, A. VERMEULEN, M. ANDJELKOVIC, I. FITZ-JAMES, P. IN'T VELD, Q. DENON, R. VÉRHE & J. DEBEVERE (2008):

Heat resistance of *Bacillus cereus* emetic toxin, cereulide.

Lett. Appl. Microbiol. 46, 536-541.

RANGANATHA, H. G., S. ZAKI & B. S. KESHAVAMURTHY (1981):

Bacillus cereus as a Cause of Abortion in a Mare.

Curr. Sci. 50, 458.

ROWAN, N. J. & J. G. ANDERSON (1998):

Diarrhoeal enterotoxin production by psychrotrophic *Bacillus cereus* present in reconstituted milk-based infant formulae (MIF).

Lett. Appl. Microbiol. 26, 161-165.

ROWAN, N. J., G. CALDOW, C. G. GEMMELL & I. S. HUNTER (2003):

Production of diarrheal enterotoxins and other potential virulence factors by veterinary isolates of *Bacillus* species associated with nongastrointestinal infections.

Appl. Environ. Microbiol. 69, 2372-2376.

RYAN, P. A., J. D. MACMILLAN & B. A. ZILINSKAS (1997):

Molecular cloning and characterization of the genes encoding the L(1) and L(2) components of hemolysin BL from *Bacillus cereus*.

J. Bacteriol. 179, 2551-2556.

RYU, J. H. & L. R. BEUCHAT (2005):

Biofilm formation and sporulation by *Bacillus cereus* on a stainless steel surface and subsequent resistance of vegetative cells and spores to chlorine, chlorine dioxide, and a peroxyacetic acid-based sanitizer.

J. Food Prot. 68, 2614-2622.

SAMAPUNDO, S., M. HEYNDRICKX, R. XHAFFERI & F. DEVLIEGHERE (2011):

Incidence, diversity and toxin gene characteristics of *Bacillus cereus* group strains isolated from food products marketed in Belgium.

Int. J. Food Microbiol. 150, 34-41.

SATO, K., S. ICHIIYAMA, M. OHMURA, M. TAKASHI, N. AGATA, M. OHTA & N. NAKASHIMA (1998):

A case of urinary tract infection caused by *Bacillus cereus*.

J. Infect. 36, 247-248.

SCALLAN, E., R. M. HOEKSTRA, F. J. ANGULO, R. V. TAUXE, M. A. WIDDOWSON, S. L. ROY, J. L. JONES & P. M. GRIFFIN (2011):

Foodborne illness acquired in the United States--major pathogens.

Emerg. Infect. Dis. 17, 7-15.

SCHIEFER, B., K. R. MACDONALD, G. G. KLAVANO & A. A. VAN DREUMEL (1976):

Pathology of *Bacillus cereus* mastitis in dairy cows.

Can. Vet. J. 17, 239-243.

SCHMIDT, F. R. (2004):

Recombinant expression systems in the pharmaceutical industry.

Appl. Microbiol. Biotechnol. 65, 363-372.

SCHUH, J. & D. WEINSTOCK (1985):

Bovine abortion caused by *Bacillus cereus*.

J. Am. Vet. Med. Assoc. 187, 1047-1048.

SEIDEL, K. E., C. PFISTERER, S. HORMANSDORFER & J. BAUER (1996):

The detection of toxinogenic *Bacillus cereus* strains.

Zentralbl. Veterinarmed. B. 43, 421-428.

SHINAGAWA, K., Y. UENO, D. HU, S. UEDA & S. SUGII (1996):

Mouse lethal activity of a HEp-2 vacuolation factor, cereulide, produced by *Bacillus cereus* isolated from vomiting-type food poisoning.

J. Vet. Med. Sci. 58, 1027-1029.

SHIOTA, M., K. SAITOU, H. MIZUMOTO, M. MATSUSAKA, N. AGATA, M. NAKAYAMA, M. KAGE, S. TATSUMI, A. OKAMOTO, S. YAMAGUCHI, M. OHTA & D. HATA (2010):

Rapid detoxification of cereulide in *Bacillus cereus* food poisoning.

Pediatrics. 125, 951-955.

SIMONEN, M. & I. PALVA (1993):

Protein secretion in *Bacillus* species.

Microbiol. Rev. 57, 109-137.

SLAMTI, L. & D. LERECLUS (2002):

A cell-cell signaling peptide activates the PlcR virulence regulon in bacteria of the *Bacillus cereus* group.

EMBO J. 21, 4550-4559.

SMITH, N. R., R. E. GORDON & F. E. CLARK (1946):

Aerobic mesophilic sporeforming bacteria.

United States Departement of Agriculture. Miscellaneous Publication. 559.

SMITH, N. R., R. E. GORDON & F. E. CLARK (1952):

Aerobic sporeforming bacteria.

United States Departement of Agriculture. Agriculture Monograph. 16.

SPIRA, W. M. & J. M. GOEPFERT (1972):

Bacillus cereus-induced fluid accumulation in rabbit ileal loops.

Appl. Microbiol. 24, 341-348.

SPIRA, W. M. & J. M. GOEPFERT (1975):

Biological characteristics of an enterotoxin produced by *Bacillus cereus*.

Can. J. Microbiol. 21, 1236-1246.

SPIRA, W. M. & G. J. SILVERMAN (1979):

Effects of glucose, pH, and dissolved-oxygen tension on *Bacillus cereus* growth and permeability factor production in batch culture.

Appl. Environ. Microbiol. 37, 109-116.

STADLER, V., T. FELGENHAUER, M. BEYER, S. FERNANDEZ, K. LEIBE, S. GUTTLER, M. GRÖNING, K. KÖNIG, G. TORRALBA, M. HAUSMANN, V. LINDENSTRUTH, A. NESTEROV, I. BLOCK, R. PIPKORN, A. POUSTKA, F. R. BISCHOFF & F. BREITLING (2008):

Combinatorial synthesis of peptide arrays with a laser printer.

Angew. Chemie., Int. Ed. Engl. 47, 7132-7135.

STEEN, M. K., L. A. BRUNOMURTHA, G. CHAUX, H. LAZAR, S. BERNARD & C. SULIS (1992):

Bacillus cereus endocarditis - report of a case and review.

Clin. Infect. Dis. 14, 945-946.

STENFORS ARNESEN, L. P., A. FAGERLUND & P. E. GRANUM (2008):

From soil to gut: *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins.

FEMS Microbiol. Rev. 32, 579-606.

STENFORS, L. P. & P. E. GRANUM (2001):

Psychrotolerant species from the *Bacillus cereus* group are not necessarily *Bacillus weihenstephanensis*.

FEMS Microbiol. Lett. 197, 223-228.

STUDIER, F. W. & B. A. MOFFATT (1986):

Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes.

J. Mol. Biol. 189, 113-130.

SUTHERLAND, A. D. & A. M. LIMOND (1993):

Influence of pH and sugars on the growth and production of diarrhoeagenic toxin by *Bacillus cereus*.

J. Dairy Res. 60, 575-580.

TERPE, K. (2006):

Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems.

Appl. Microbiol. Biotechnol. 72, 211-222.

TERPLAN, G. (1957):

Saprophyten als Mastitiserreger.

Arch. Lebensmittelhyg. 8, 37-38.

THAENTHANEE, S., A. C. L. WONG & W. PANBANGRED (2005):

Phenotypic and genotypic comparisons reveal a broad distribution and heterogeneity of hemolysin BL genes among *Bacillus cereus* isolates.

Int. J. Food Microbiol. 105, 203-212.

THOMAS, B. S., M. J. BANKOWSKI & W. K. LAU (2012):

Native valve *Bacillus cereus* endocarditis in a non-intravenous-drug-abusing patient.

J. Clin. Microbiol. 50, 519-521.

THOMASSIN, S., M. P. JOBIN & P. SCHMITT (2006):

The acid tolerance response of *Bacillus cereus* ATCC14579 is dependent on culture pH, growth rate and intracellular pH.

Arch. Microbiol. 186, 229-239.

THOMPSON, N. E., M. J. KETTERHAGEN, M. S. BERGDOLL & E. J. SCHANTZ (1984):

Isolation and some properties of an enterotoxin produced by *Bacillus cereus*.

Infect. Immun. 43, 887-894.

TOKIEDA, K., Y. MORIKAWA, K. MAEYAMA, K. MORI & K. IKEDA (1999):

Clinical manifestations of *Bacillus cereus* meningitis in newborn infants.

J. Paediatr. Child Health. 35, 582-584.

TRAN, S. L., E. GUILLEMET, M. GOHAR, D. LERECLUS & N. RAMARAO (2010):

CwpFM (EntFM) is a *Bacillus cereus* potential cell wall peptidase implicated in adhesion, biofilm formation, and virulence.

J. Bacteriol. 192, 2638-2642.

TRAN, S. L., E. GUILLEMET, M. NGO-CAMUS, C. CLYBOUW, A. PUHAR, A. MORIS, M. GOHAR, D. LERECLUS & N. RAMARAO (2011):

Haemolysin II is a *Bacillus cereus* virulence factor that induces apoptosis of macrophages.

Cell. Microbiol. 13, 92-108.

TSILIA, V., B. DEVREESE, I. DE BAENST, B. MESUERE, A. RAJKOVIC, M. UYTENDAELE, T. VAN DE WIELE & M. HEYNDRICKX (2012):

Application of MALDI-TOF mass spectrometry for the detection of enterotoxins produced by pathogenic strains of the *Bacillus cereus* group.

Anal. Bioanal. Chem. 404, 1691-1702.

TURNBULL, P. C., K. JORGENSEN, J. M. KRAMER, R. J. GILBERT & J. M. PARRY (1979):

Severe clinical conditions associated with *Bacillus cereus* and the apparent involvement of exotoxins.

J. Clin. Pathol. 32, 289-293.

TYNDALL, J. (1877):

Further researches on the development and vital persistence of putrefactive and infective organisms from a physical point of view.

Phil. Trans. R. Soc. 167, 149-206.

TZOKOV, S. B., N. R. WYBORN, T. J. STILLMAN, S. JAMIESON, N. CZUDNOCHOWSKI, P. J. ARTYMIUK, J. GREEN & P. A. BULLOUGH (2006):

Structure of the hemolysin E (HlyE, ClyA, and SheA) channel in its membrane-bound form.

J. Biol. Chem. 281, 23042-23049.

UCHINO, Y., N. IRIYAMA, K. MATSUMOTO, Y. HIRABAYASHI, K. MIURA, D. KURITA, Y. KOBAYASHI, M. YAGI, H. KODAIRA, A. HOJO, S. KOBAYASHI, Y. HATTA & J. TAKEUCHI (2012):

A case series of *Bacillus cereus* septicemia in patients with hematological disease.

Intern. Med. 51, 2733-2738.

VAN DER VOORT, M. & T. ABEE (2009):

Transcriptional regulation of metabolic pathways, alternative respiration and enterotoxin genes in anaerobic growth of *Bacillus cereus* ATCC 14579.

J. Appl. Microbiol. 107, 795-804.

VAN DER ZWET, W. C., G. A. PARLEVLIET, P. H. SVELKOU, J. STOOF, A. M. KAISER, A. M. VAN FURTH & C. M. VANDENBROUCKE-GRAULS (2000):

Outbreak of *Bacillus cereus* infections in a neonatal intensive care unit traced to balloons used in manual ventilation.

J. Clin. Microbiol. 38, 4131-4136.

VANDEN BROECK, D., C. HORVATH & M. J. S. DE WOLF (2007):

Vibrio cholerae: Cholera toxin.

Int. J. Biochem. Cell Biol. 39, 1771-1775.

VILAIN, S., Y. LUO, M. B. HILDRETH & V. S. BROZEL (2006):

Analysis of the life cycle of the soil saprophyte *Bacillus cereus* in liquid soil extract and in soil.

Appl. Environ. Microbiol. 72, 4970-4977.

VON HEIJNE, G. (1985):

Signal sequences: The limits of variation.

J. Mol. Biol. 184, 99-105.

WALLACE, A. J., T. J. STILLMAN, A. ATKINS, S. J. JAMIESON, P. A. BULLOUGH, J. GREEN & P. J. ARTYMIUK (2000):

E. coli hemolysin E (HlyE, ClyA, SheA): X-ray crystal structure of the toxin and observation of membrane pores by electron microscopy.

Cell. 100, 265-276.

WEHRLE, E., A. DIDIER, M. MORAVEK, R. DIETRICH & E. MÄRTLBAUER (2010):

Detection of *Bacillus cereus* with enteropathogenic potential by multiplex real-time PCR based on SYBR green I.

Mol. Cell. Probes. 24, 124-130.

WEHRLE, E., M. MORAVEK, R. DIETRICH, C. BÜRK, A. DIDIER & E. MÄRTLBAUER (2009):

Comparison of multiplex PCR, enzyme immunoassay and cell culture methods for the detection of enterotoxinogenic *Bacillus cereus*.

J. Microbiol. Methods. 78, 265-270.

WERNERY, U., M. ALI & J. E. COOPER (1996):

Bacillus cereus abortion in a nine year old dromedary camel - A case report.

J. Camel Pract. Res. 3, 153.

WIJMAN, J. G., P. P. DE LEEUW, R. MOEZELAAR, M. H. ZWIETERING & T. ABEE (2007):

Air-liquid interface biofilms of *Bacillus cereus*: formation, sporulation, and dispersion.

Appl. Environ. Microbiol. 73, 1481-1488.

WIJNANDS, L. M., J. B. DUFRENNE, F. M. ROMBOUTS, P. H. IN'T VELD & F. M. VAN LEUSDEN (2006):

Prevalence of potentially pathogenic *Bacillus cereus* in food commodities in The Netherlands.

J. Food Prot. 69, 2587-2594.

YANG, I. C., D. Y. SHIH, J. Y. WANG & T. M. PANI (2007):

Development of rapid real-time PCR and most-probable-number real-time PCR assays to quantify enterotoxigenic strains of the species in the *Bacillus cereus* group.

J. Food Prot. 70, 2774-2781.

YANG, I. C., D. Y. C. SHIH, T. P. HUANG, Y. P. HUANG, J. Y. WANG & T. M. PAN (2005):

Establishment of a novel multiplex PCR assay and detection of toxigenic strains of the species in the *Bacillus cereus* group.

J. Food Prot. 68, 2123-2130.

YOUNG, J. A. T. & R. J. COLLIER (2007):

Anthrax toxin: Receptor binding, internalization, pore formation, and translocation.

Annu. Rev. Biochem. 76, 243-265.

ZIGHA, A., E. ROSENFELD, P. SCHMITT & C. DUPORT (2006):

Anaerobic cells of *Bacillus cereus* F4430/73 respond to low oxidoreduction potential by metabolic readjustments and activation of enterotoxin expression.

Arch. Microbiol. 185, 222-233.

ZIGHA, A., E. ROSENFELD, P. SCHMITT & C. DUPORT (2007):

The redox regulator Fnr is required for fermentative growth and enterotoxin synthesis in *Bacillus cereus* F4430/73.

J. Bacteriol. 189, 2813-2824.

An erster Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. E. Märtlbauer herzlich für die freundliche Überlassung des Themas und die stets gewährte Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit bedanken.

Frau Dr. A. Didier danke ich für die Betreuung der Dissertation und die sorgfältige Durchsicht des Manuskripts.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Dr. R. Dietrich für seine freundliche Hilfsbereitschaft und die zahlreichen fundierten Anregungen, welche zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Frau B. Minich und Frau F. Witzko danke ich sehr herzlich für die ausgezeichnete technische Unterstützung und die freundschaftliche Verbundenheit.

Weiterhin möchte ich mich auch bei allen anderen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts – insbesondere Herrn Dr. H. Becker, Frau G. Acar, Frau S. Straßner, Ina und Ann-Katrin – für das angenehme Arbeitsklima und die gute kollegiale Zusammenarbeit bedanken.

Frau Dr. E.-L. von Rüden sei für die Einarbeitung am konfokalen Mikroskop gedankt.

Mein außerordentlicher Dank gilt meinen Eltern, die mich die ganzen Jahre unterstützt und motiviert haben.

Zuletzt danke ich von ganzem Herzen Alexander für seinen liebevollen Rückhalt.